

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios

Henrique Schneider Pestano

Pelotas, 2017

Henrique Schneider Pestano

Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P476i Pestano, Henrique Schneider

Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios / Henrique Schneider Pestano ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador. – Pelotas , 2017.

55f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1.Progesterona. 2. Termografia. 3. Cortisol. 4. Estradiol. 5.Inflamação. I. Gasperin, Bernardo Garziera, oriente. II. Título.

CDD : 636.213

Henrique Schneider Pestano

Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/01/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)
Doutor em Fisiopatologia da Reprodução pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Karina Lemos Goularte
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade: University of Minnesota

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Lizane e Telmo e a minha irmã, Caroline, por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo para continuar estudando e pelo apoio incondicional nas minhas decisões.

Agradeço à minha namorada, Mariângela, pela ajuda na elaboração dessa dissertação, pelo companheirismo e apoio durante o tempo que estamos juntos.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, dando conselhos, incentivando, dividindo tristezas e alegrias, a vocês, muito obrigado e que a gente nunca mude.

Ao meu orientador, Bernardo Gasperin, por confiar e acreditar em mim, pela orientação em meu experimento e principalmente pelo amigo que se tornou.

Ao grupo ReproPel e a todos colegas e amigos que fazem parte dele, graças a vocês pude realizar todas as etapas do meu experimento, sempre sabendo que teria ajuda e apoio quando precisasse.

Agradeço a Faculdade de Veterinária, ao grupo NUPEEC, a EMBRAPA e ao Centro Agropecuário da Palma.

À CAPES, pela concessão da bolsa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro recebido para a realização deste trabalho.

E a Deus, pela vida maravilhosa que tenho.

Resumo

PESTANO, Henrique Schneider. **Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios**. 2017. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

As primeiras tentativas de indução artificial da lactação (IAL) em vacas foram realizadas nas décadas de 40 e 60 e buscavam mimetizar o perfil endócrino do período final da gestação, possibilitando a lactação na ausência de uma gestação. A técnica tem inúmeras vantagens, como ser financeiramente mais viável que aquisição de novilhas, evitar descarte de vacas de alto mérito genético, prolongar a vida produtiva das vacas e possibilitar que fêmeas repetidoras de serviço voltem a gestar. Mesmo com tantas vantagens, os protocolos de indução tiveram pouca evolução, sendo a técnica subutilizada. Algumas limitações da técnica incluem lesões e fraturas de alguns animais submetidos aos protocolos, não responsividade de alguns animais, produção leiteira 20 a 30% menor que uma lactação natural, elevado número de manejos e aplicações hormonais que repercutem em longo período de estro. Com base no acima exposto, o presente estudo teve por objetivo determinar o perfil endócrino e alterações em marcadores inflamatórios e de estresse causadas pela técnica de IAL. Ainda, investigou-se uma alternativa para diminuir o número de aplicações de progesterona injetável. Em um primeiro estudo, cinco vacas foram submetidas a um protocolo convencional de indução da lactação (grupo IND) e seis serviram de controle (CON), recebendo apenas um dispositivo vaginal (DIV) contendo 1g de progesterona (P4). Foram coletadas amostras de sangue e registrados termogramas dos locais da aplicação dos hormônios e do casco posterior esquerdo de cada animal ao longo de 14 dias. As fêmeas submetidas ao protocolo de indução apresentaram desenvolvimento da glândula mamária e manifestação de estro por cerca de 12 dias, a partir do dia 9. Verificou-se que não houve diferença estatística em relação a temperatura do posterior, níveis de cortisol, colesterol, albumina, proteína sérica total e paraoxonase entre as vacas IND e CON ($P > 0,05$). Em relação ao perfil endócrino, as vacas IND apresentaram níveis inferiores de estradiol no D0 ($51,9 \pm 16 \text{ pg/ml}$) em relação aos dias 2, 4, 8 e 12 (acima de 2000 pg/ml ; $P < 0,05$). Os níveis de progesterona das vacas IND em D4 ($9,4 \pm 1,6 \text{ ng/ml}$) foram significativamente superiores ($P < 0,05$) aos observados no mesmo momento nas vacas CON ($4,2 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$). Com base no perfil endócrino de P4 observado no experimento 1, em um segundo experimento investigou-se a possibilidade de utilizar a via vaginal para suplementação de P4. Não houve diferença nos níveis de P4 circulantes nas fêmeas dos grupos 1g e 1,9g de P4 intravaginal, porém, ambos os grupos apresentaram níveis inferiores em relação ao grupo 3,8g de P4. Conclui-se que o manejo diário e as injeções de hormônios do protocolo de IAL não promovem alterações significativas em marcadores de estresse e de reação inflamatória, sendo o maior transtorno

relacionado ao prolongado período de estro. Ainda, os níveis de progesterona observados sugerem a possibilidade de utilização de dispositivos intravaginais em substituição às injeções diárias. As informações obtidas neste estudo darão suporte ao aprimoramento dos protocolos de indução.

Palavras-chave: progesterona; termografia; cortisol; estradiol; inflamação

Abstract

PESTANO, Henrique Schneider. **Induction of lactation in cows: endocrine profile and inflammatory markers**. 2017. 55f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The first attempts of artificial induction of lactation (AIL) in cows have been performed in the decades of 40 and 60, and sought to mimic the endocrine profile of the final period of gestation, enabling the lactation in the absence of a pregnancy. The technique has numerous advantages, such as being more financially feasible than the purchase of heifers, avoids culling of high genetic merit cows, extends the productive life of cows and allows females to get pregnant after the protocol. Even with so many advantages, the induction protocols had little evolution, being the technique sub utilized. Some limitations of the technique include injuries and fractures of some animals submitted to protocols, nonresponsiveness of some animals, milk production 20 to 30% lower than a natural lactation, intense animal handling and hormonal applications that result in long period of estrus. Based on the above mentioned, the objective of this study was to determine the endocrine profile and alterations in stress and inflammation markers caused by AIL technique. Furthermore, it was investigated an alternative to replace the application of injectable progesterone. In a first study, five cows were subjected to a conventional protocol for induction of lactation (IND) and six served as control (CON), receiving only one intravaginal device (DIV) containing 1g of progesterone (P4). Blood samples were collected and thermograms were recorded from the sites of hormones application and from the left hind hoof of each animal over 14 days. The females subjected to the protocol showed mammary gland development and estrus manifestation for approximately 12 days starting on day 9. It was found that there was no statistical difference in relation to cortisol, cholesterol, albumin, serum protein, and paraoxonase between the cows IND and CON ($P > 0.05$). Regarding the endocrine profile, the cows IND presented lower levels of estradiol in D0 (51.9 ± 16 pg/ml) in relation to days 2, 4, 8 and 12 (above 2000pg/ml; $P < 0.05$). The levels of progesterone in cows IND at D4 (9.4 ± 1.6 ng/ml) were significantly higher than those observed in the same moment in CON cows (4.2 ± 0.3 ng/ml; $P < 0.05$). Based on the observed progesterone endocrine profile in experiment 1, in a second experiment it was investigated the possibility of using intravaginal devices for P4 supplementation. There was no difference in the levels of P4 in females from groups 1g and 1.9g of P4, however, both groups showed lower levels in relation to group 3.8g P4. It is concluded that the management and the hormone injections of the AIL protocol does not promote significant stress and inflammatory reaction, being the long period of estrus manifestation the main inconvenience. The levels of progesterone observed suggest the possibility of using intravaginal devices to replace daily progesterone injections.

The information obtained in this study will support the improvement of protocols for lactation induction.

Keywords: progesterone; thermography; cortisol; estradiol; inflammation

Lista de Figuras

Artigo 1- **Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução**

Figura 1	Evolução dos protocolos de indução da lactação.....	21
----------	---	----

Artigo 2 - **Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios**

Figura 1	A) Temperatura do membro posterior esquerdo dos animais do grupo controle e grupo induzido. B) Temperatura do casco posterior esquerdo dos animais do grupo controle e grupo induzido.....	33
Figura 2	Níveis de Cortisol apresentado pelas vacas do grupo controle e grupo IND.....	34
Figura 3	Níveis de PON1 apresentado pelas vacas do grupo controle e grupo IND.....	34
Figura 4	Níveis de Colesterol (A), Proteína sérica total (B) e Albumina (C) apresentado pelas vacas do grupo controle e IND.....	35
Figura 5	Níveis de Progesterona e Estrógeno dos animais do grupo controle e grupo induzido (Experimento 1).....	37
Figura 6	Níveis de Progesterona dos animais do experimento 2.....	38

Lista de Abreviaturas e Siglas

BE	Benzoato de estradiol
rBST	Somatotropina recombinante bovina
CCS	Contagem de células somáticas
CEEA	Comissão de ética em experimentação animal
CLS	Corpos lúteos
CONT	Controle
D	Dia
DEX	Dexametasona
DIV	Dispositivo intravaginal
E2	Estradiol
ECP	Cipionato de estradiol
FIG	Figura
GH	Hormônio do crescimento
H	Hora
I.M.	Intramuscular
IAL	Indução artificial da lactação
IGF - 2	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IND	Induzido
MU	Massagem de úbere
MAP	Medroxiprogesterona
N	Número
P4	Progesterona
PFA	Proteínas de fase aguda
PGF	Prostaglandina
PON 1	Paraoxonase 1
RESP	Reserpine

RPM	Rotações por minuto
T 3	Triiodotironina
T 4	Tiroxina
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas

Lista de Símbolos

mg	Miligramas
Kg	Quilogramas
ml	Mililitro
ng	Nanograma
pg	Picograma
µg	Micrograma
±	Mais ou Menos
<	Menor
>	Maior
°C	Graus celsius
mm	Milímetros
L	Litro
dl	Decilitro
U	Unidade

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Artigos.....	15
2.1 Artigo 1.....	15
2.2 Artigo 2.....	25
3 Considerações Finais.....	47
Referências.....	49
Anexos.....	54

1 Introdução

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, com mais de 215 milhões de cabeças, sendo que mais de 21 milhões são bovinos de aptidão leiteira (IBGE 2015). Em 2014, a produção de leite foi de, aproximadamente, 35,2 bilhões de litros, tornando o Brasil o quinto maior produtor mundial. Apesar de grande produtor, o Brasil é um grande importador de leite, sendo que nos primeiros oito meses de 2016 as importações superaram as exportações em U\$301 milhões (MILKPOINT). O Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor de leite do país, representando 13,3% da produção nacional (4,7 bilhões de litros) (IBGE2015).

Devido à importância da bovinocultura de leite, cada vez mais se buscam alternativas para que esta atividade se torne mais competitiva frente às outras. Para isso é necessário a maximização da pecuária leiteira, reduzindo custos, melhorando a eficiência produtiva e reprodutiva e qualificando mão-de-obra. A indução da lactação surge como ferramenta para melhorar a eficiência do sistema leiteiro, por possibilitar a obtenção de lactação de fêmeas que falham em conceber. Os protocolos de indução da lactação hoje disponíveis comercialmente no Brasil basicamente consistem na aplicação de progesterona e estradiol por sete dias, seguido de um período de aplicação de estradiol isoladamente por mais sete dias e cinco dias de massagem de úbere, iniciando a ordenha após 21 dias de manejo. A técnica consiste em mimetizar o período final da gestação, fazendo com que a vaca comece a lactar sem que tenha concebido, com uma produção estimada em até 65-80% de uma lactação normal (Freitas *et al.*, 2010)

O protocolo pode evitar o descarte precoce de animais com problemas reprodutivos, que são a causa de 27,7% da eliminação das vacas (Silva *et al.*, 2008), com isso diminuindo a taxa de reposição, aumentando a vida produtiva da fêmea, aumentando a eficiência produtiva da propriedade (Magliaro *et al.*, 2004; Mellado *et al.*, 2011). Porém, não há relatos de trabalhos que tenham mensurado a possível reação inflamatória e estresse causados pela indução da lactação e também não há dados sobre o perfil endócrino dos animais submetidos aos protocolos atuais.

O manejo intenso dos animais é potencialmente gerador de estresse e desconforto (Ferreira *et al.*, 2012), principalmente pelo fato de que boa parte dos hormônios são diluídos em veículo oleoso para aplicação intramuscular. Os altos níveis de estradiol aplicados durante o tratamento também induzem a um comportamento estral intenso e prolongado. O comportamento de hiperatividade induzido pelos estrógenos gera problemas como claudicação, compressões nervosas ou fraturas causadas pelo aumento no número de montas (Chakriyarat *et al.*, 1978).

Como existe demanda comercial pela indução de lactação, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento hormonal gera estresse ou comprometimentos físicos e traçar o perfil endócrino dos animais submetidos ao protocolo. Para isso, coletas de amostras de sangue foram realizadas para determinar os níveis de progesterona e estradiol, de proteína total, colesterol e cortisol sérico e de proteínas de fase aguda negativa (albumina e paraoxonase - PON1), bem como, realizar avaliações termográficas dos pontos de aplicação hormonal e dos cascos.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução

H.S. Pestano, C.S. Haas, M.Q. Santos, F.C. Oliveira, B.G. Gasperin

Artigo publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal

Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.3, p.315-321, jul./set. 2015.
Disponível em www.cbra.org.br - Recebido: 12 de junho de 2015 - Aceito: 23 de
março de 2016

Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução

Artificial induction of lactation in cattle: history and evolution

H.S. Pestano, C.S. Haas, M.Q. Santos, F.C. Oliveira, B.G. Gasperin¹

Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Reprodução Animal (ReproPEL), Capão do Leão, RS, Brasil.

¹Correspondência: bggasperin@gmail.com

Resumo

O descarte precoce de vacas leiteiras por problemas reprodutivos, por falhas no manejo e por outros fatores que levem as vacas a encerrarem uma lactação sem estarem prenhes aumenta os custos e diminui a rentabilidade da produção de leite. Como alternativa, pode-se utilizar a indução artificial de lactação, prática de manejo que mimetiza o perfil endócrino da vaca no periparto com o objetivo de induzir a síntese láctea pela glândula mamária. Os protocolos de indução em bovinos são estudados desde a década de 40, e os primeiros estudos envolviam aplicações hormonais por até nove meses. Nos anos 70, houve uma evolução significativa, quando foi estabelecido que sete dias de aplicação de hormônios esteróides eram suficientes para induzir as vacas a lactarem. Protocolos utilizando progesterona e estradiol como base foram testados ao longo dos anos e, atualmente, os protocolos comerciais têm a duração de aproximadamente 21 dias e utilizam aplicações de grandes volumes de hormônios em manejos diários. Embora os protocolos possibilitem boa taxa de resposta e de produção de leite, até o presente momento não foram avaliados os impactos nos animais. O objetivo desta revisão é demonstrar a evolução dos protocolos, suas aplicações, desvantagens, possíveis soluções e perspectivas.

Palavras-chave: estrógeno, glândula mamária, hormônios, progesterona, protocolo.

Abstract

The early culling of dairy cows due to reproductive failure, management problems and other factors that lead the dairy cows to be dried-off without being pregnant, increase costs and decrease profitability of milk production. A possible alternative is the use of artificial lactation induction, a tool that mimics peripartum endocrine profiles with the aim of inducing milk synthesis from the mammary gland. Protocols of induction of lactation in cattle have been studied since the 1940s, and the first studies consisted of hormonal applications for nine months. In the 1970s, there was a significant evolution, when it was established that seven days of steroid hormones application were sufficient to induce lactation. Since then, several protocols using progesterone and estradiol have been tested. Currently, commercial protocols lasts for 21 days and use large volumes of hormones, requiring daily handling of animals. Although current protocols are efficient, enabling good response rate and milk production, so far the degree of discomfort to which animals are exposed is unknown. The purpose of this review is to provide background information on the evolution of protocols, their applications, drawbacks, possible solutions and prospects.

Keywords: estrogen, hormones, mammary gland, progesterone, protocol.

Introdução

A indução da lactação consiste em mimetizar os níveis hormonais do período final da gestação da vaca, fazendo com que ela inicie a secreção de leite sem que tenha concebido um bezerro. Trata-se de uma técnica importante na atividade leiteira, possibilitando a produção de grandes volumes de leite (Mellado *et al.*, 2011),

embora seja subutilizada.

Transtornos reprodutivos causam aumento no intervalo entre partos, menor produção de leite, abate de fêmeas em idade produtiva e aumento dos custos operacionais. Por conseguinte, culminam em redução da lucratividade da atividade e aumento da reposição de animais, ocasionando a necessidade de um maior número de novilhas, o que pode ser menos viável em relação à indução da lactação de fêmeas existentes na propriedade (Magliaro *et al.*, 2004). Portanto, a indução da lactação pode ser útil em casos em que, ao final de uma lactação, fêmeas de alto mérito produtivo não se encontrem gestantes (Freitas *et al.*, 2010). Além disso, pode ser utilizada para obter lactação de novilhas que, após todo o investimento na cria e recria, falham em conceber (Smith e Schanbacher, 1974).

Protocolos de indução de lactação estão sendo testados desde os anos 40 (Walker e Stanley, 1941), e a partir de então evoluíram pouco, uma vez que envolvem muito manejo, há variabilidade de resposta, apresentam elevado custo e causam desconforto para os animais (Smith e Schanbacher, 1973; Chakriyarat *et al.*, 1978; Magliaro *et al.*, 2004). Modificações são necessárias na tentativa de torná-los mais eficientes e, portanto, buscam-se protocolos que aumentem o número de vacas responsivas, bem como o volume de leite produzido e possuam manejo simplificado. Além disso, a preservação do bem-estar animal deve ser o objetivo de toda a pesquisa visando a melhorias das biotécnicas. O objetivo deste artigo é revisar a evolução dos protocolos de indução da lactação em vacas, discutir a eficiência e as limitações deles e algumas perspectivas.

Fisiologia da glândula mamária bovina

Embora não seja o foco da presente revisão, o entendimento da fisiologia da glândula mamária é indispensável para compreender os protocolos de indução disponíveis e elaborar novas técnicas, mais eficientes. O desenvolvimento da glândula mamária, a síntese de colostro e leite envolvem a mamogênese, a colostrogênese, a lactogênese e a galactopoiese.

Entende-se por mamogênese o período de crescimento da glândula mamária em que ocorre o desenvolvimento final dos ductos e do sistema lóbulo-alveolar. Para que isso ocorra, é necessário ter simultaneamente a presença de estradiol (E2) e progesterona (P4), inicialmente liberados pelos ovários e, posteriormente, na gestação, pela placenta (Tucker, 2000). A partir do conhecimento sobre a fisiologia da gestação, os primeiros protocolos de indução foram desenvolvidos. Estudos pioneiros demonstraram que poderia ser recriado o momento final da gestação, utilizando-se como base hormônios esteroides. Na vaca, a progesterona permanece elevada durante toda a gestação; já o estrogênio tem maior concentração na segunda metade da gestação, induzindo um grande crescimento alveolar neste período (Erb, 1977; Tucker, 1987). A glândula mamária só terá sua maturação após a primeira lactação, devido à ação de hormônios como: hormônio de crescimento (GH) e suas somatomedinas (IGF-1/IGF-2), estrogênio, progesterona, prolactina e/ou lactogênio placentário (Tucker, 2000).

A fase de secreção de leite é denominada lactogênese. Em uma lactação fisiológica, nos dias anteriores ao parto, ocorre o acúmulo de imunoglobulinas para formação do colostro, sendo esta fase conhecida como colostrogênese. Também há uma queda dos níveis de P4 e uma elevação nos níveis de E2, resultando na liberação de prolactina (Tucker, 2000). Essa queda nos níveis de P4 é de extrema importância, pois a progesterona é prejudicial à lactogênese, inibindo o aumento de receptores de prolactina na glândula mamária; diminui a sinergia do estradiol com a prolactina e também aumenta a proporção de corticoides ligados à proteína ligante de glicocorticoide, diminuindo a quantidade deles livres para atuar na célula mamária. Por sua vez, os glicocorticoides

desempenham um papel importante por induzirem a diferenciação celular para que ocorra a síntese de caseína e proteínas do soro, sob estímulo da prolactina (Tucker, 2000).

A galactopoiese consiste no processo de manutenção da produção de leite. Para manter essa função, é necessária a contínua secreção de hormônios galactopoieticos como: prolactina; GH; glicocorticoides; tri-iodotironina (T3) e tiroxina (T4); ocitocina; insulina e paratormônio. A remoção regular do leite também tem uma função importante na manutenção da lactação (Tucker, 2000). A somatotropina é muito relevante na síntese láctea, sendo responsável pela mobilização das reservas corporais, o que aumenta a produção de IGF-1, direcionando os nutrientes do organismo para a síntese do leite (Bauman, 1999).

Indução da lactação: histórico

Os primeiros relatos de indução de lactação são de Walker e Stanley (1941), que induziram novilhas utilizando E2. Malpress (1947) conduziu vários estudos com novilhas e vacas, no entanto seus protocolos duravam até nove meses e utilizavam grandes doses de hormônios, necessitando de muito manejo e causando desconforto aos animais. Por décadas, acreditou-se que longos períodos eram necessários para ocorrer o completo desenvolvimento alveolar.

A primeira grande evolução dos protocolos de indução surgiu quando Smith e Schanbacher (1973) testaram um protocolo de sete dias, em que as vacas eram tratadas com injeções de 0,1 mg/kg de estradiol-17 β e 0,25 mg/kg de progesterona diluídos em etanol, aplicados duas vezes ao dia. Eles obtiveram um excelente resultado, induzindo 70% das vacas, porém produzindo apenas 70% do leite de uma lactação normal. O mesmo grupo também demonstrou ser viável a indução com protocolos curtos em novilhas e concluíram que o número de dias (7 a 10) e a dose dos hormônios têm pouca influência nos resultados, embora tenha sido utilizado um pequeno número de animais por grupo (Smith e Schanbacher, 1974). Utilizando um protocolo semelhante aos acima descritos, Narendran et al. (1974) não observaram alterações significativas na composição do tecido da glândula mamária nem na composição do leite durante a lactação induzida. Já Sawyer et al. (1986) observaram uma elevação nos níveis de proteína e gordura e diminuição de lactose nos primeiros 14 dias após a indução em novilhas induzidas em comparação com novilhas paridas.

Usando como base o protocolo de Smith e Schanbacher (1973), Collier et al. (1975) adicionaram injeções de dexametasona nos dias 18 e 20 após o início das injeções de P4 e de estradiol-17 β , na tentativa de mimetizar os níveis de glicocorticoides que aumentam drasticamente no período que antecede o parto e que tem papel importante na diferenciação do tecido mamário (Tucker, 2000). Após o período de exposição ao E2 e P4, a administração de PGF, corticoide (dexametasona) associado a PGF ou ocitocina, induzem a elevação nos níveis de prolactina (Sawyer *et al.*, 1986). Collier et al. (1977) modificaram novamente o protocolo, desta vez introduzindo quatro doses de reserpine, um alcaloide anti-hipertensivo atuando no sistema nervoso simpático, que também é capaz de estimular a produção de prolactina, a qual possibilita um acréscimo na produção leiteira, aumentando a produção das vacas tratadas (Tucker, 1987).

Desde a descrição dos primeiros protocolos práticos de indução, poucas foram as investigações de formas alternativas. Davis et al. (1983) fizeram uma tentativa de induzir vacas usando um dispositivo dispositivo intravaginal (DIV) contendo 500mg de estradiol-17 β e 1000mg de P4, dissolvidos em 40ml de acetona/etanol. Junto com as esponjas impregnadas de hormônios, as vacas também receberam injeções de dexametasona e

reserpina. De acordo com os autores, as vacas apresentaram enchimento de úbere cerca de 12 dias após a inserção dos implantes, sugerindo que é possível induzir a lactação em vacas utilizando vias alternativas e diminuindo o manejo dos protocolos. Entretanto, até o presente momento, a utilização de vias alternativas não foi explorada, provavelmente em decorrência da restrição da indução da lactação em diversos países.

Sawyer et al. (1986) testaram um protocolo com E2, P4, dexametasona, cloprostenol e ocitocina em 42 novilhas Holandesas e observaram que os animais que receberam maior quantidade de estradiol tiveram um melhor desempenho de produção de leite, sugerindo que a quantidade de estrogênio influencia no sucesso da lactação. Fleming et al. (1986) compararam o protocolo de 7 dias de E2 e P4 com outro de aplicações diárias de estradiol -17 β (0,10 mg/kg) e P4 (0,25 mg/kg), durante 21 dias e duas aplicações de dexametasona nos dias 31 e 34 depois do início do protocolo. Os resultados encontrados por eles indicaram que, com mais aplicações de estradiol, a síntese de tecido mamário foi maior, sugerindo uma maior produção de leite. Entretanto, Jewell (2002) pré-sincronizando as vacas submetidas ao protocolo de sete dias de estradiol -17 β e P4 acrescido de prostaglandina no dia 13, dexametasona e reserpina nos dias 14 a 17 após o início das injeções, obteve dados de produção similares aos observados em outros estudos, ou seja, redução de 20 a 30% em comparação a uma lactação normal. Portanto, Jewell (2002) demonstrou que é possível obter resultados condizentes com os obtidos com protocolos comerciais mesmo sem utilizar aplicações de estradiol isoladamente, ou seja, aplicando P4 e E2 simultaneamente por 7 dias. Entretanto, pelo que se sabe não foram realizados experimentos para testar a hipótese de que a aplicação de E2 isoladamente é dispensável.

Com o objetivo de aumentar a produção, Magliaro et al. (2004) e Macrina, Kauf, et al. (2011) avaliaram a viabilidade da incorporação da somatotropina bovina (bST) a protocolos, baseados no proposto por Smith e Schanbacher (1973). As vacas que receberam o bST tiveram um acréscimo de 17,8% e 36%, respectivamente, na produção de leite, mostrando que a introdução desse hormônio no protocolo é vantajosa. Entretanto, cabe ressaltar que a viabilidade de utilização de bST depende do volume produzido pela vaca e do preço do leite pago ao produtor.

Desde os primeiros relatos de indução da lactação na década de 40, houve muito pouca evolução nos protocolos. Atualmente, protocolos comerciais são muito parecidos ao utilizado por Freitas et al. (2010), envolvendo 21 dias de manejo e altos volumes de hormônios injetados diariamente, possibilitando a produção de leites com teor de sólidos dentro dos parâmetros normais. No Brasil, alguns protocolos preconizam a massagem de úbere por cerca de 5 dias para induzir a liberação de prolactina endógena, uma vez que não há reserpina disponível para este fim. A metoclopramida, um antagonista da dopamina, também é capaz de induzir um aumento transitório nos níveis de prolactina em bovinos (Jones et al., 1994) e há relatos de utilização em protocolos comerciais, porém ainda não existem informações na literatura quanto à sua eficácia. Mais recentemente, Mellado et al. (2014) mostraram que é possível submeter as vacas por duas vezes consecutivas ao protocolo de indução sem que ocorra alteração na produção de leite e na duração da lactação. A evolução dos protocolos de indução está ilustrada na Fig. 1.

Produção e composição do leite de vacas induzidas artificialmente

A variabilidade da resposta aos protocolos de indução é uma das grandes desvantagens da técnica. Embora alguns estudos relatem taxas de 88% (Jersey), 92% (Holandês; (Jewell, 2002) e 100% (Mellado et al., 2006),

outros relatam taxas inferiores. Freitas *et al.* (2010), em um estudo realizado no Brasil com vacas da raça Holandês, obtiveram 85% de vacas responsivas (produção acima de 9 kg/dia) a dois protocolos envolvendo sete dias de aplicação de progesterona e quatorze dias de administração de estradiol. No referido estudo, as vacas induzidas produziram 66,7% e 77,2% do volume produzido em lactações prévias nos grupos induzidos com cipionato e benzoato de estradiol, respectivamente. Mellado *et al.* (2006), ao avaliarem 98 vacas induzidas artificialmente, observaram uma produção equivalente a 78% da produção de vacas paridas. De forma similar, Jewell (2002) relatou que vacas induzidas artificialmente produziram 65% do volume produzido por vacas controle não induzidas. Embora haja variação na resposta, Magliaro *et al.* (2004) demonstraram que a indução artificial da lactação é mais vantajosa economicamente em comparação à aquisição de novilhas de reposição.

Os protocolos de indução artificial da lactação parecem ter pouco ou nenhum efeito sobre a composição do leite (proteína, gordura e lactose) (Narendran *et al.*, 1974; Magliaro *et al.*, 2004) e sobre a contagem de células somáticas (CCS) ((Magliaro *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2010; Macrina, Tozer, *et al.*, 2011). Em um estudo realizado no Brasil, na ausência de um grupo controle (lactação natural), os dados obtidos quanto à porcentagem de proteína, gordura, lactose e sólidos totais estiveram de acordo com os valores de referência (Freitas *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram pequenas modificações na composição, as quais variam de acordo com o protocolo hormonal utilizado. Sawyer *et al.* (1986) relataram um maior teor de gordura e proteína em novilhas induzidas, entretanto essa alteração foi transitória, ocorrendo apenas nos primeiros 14 dias de lactação. Magliaro *et al.* (2004) demonstraram que o leite proveniente de vacas induzidas apresenta maior teor de gordura e proteína em comparação com vacas de primeira lactação espontânea. Os mesmos autores não observaram diferenças nos teores de proteína e gordura em vacas induzidas tratadas ou não com bST. Por outro lado, em um estudo utilizando novilhas Holandês, Macrina, Kauf, *et al.* (2011) demonstraram que, apesar de não ter sido observada diferença no teor de gordura, a percentagem de proteína no leite foi menor nas novilhas que receberam bST durante o protocolo de indução em comparação com novilhas controle, que receberam bST somente após o início da lactação induzida.

Quanto aos resíduos hormonais no leite, (Jewell, 2002) relatou níveis de progesterona inferiores a 1,5 ng/ml entre os dias 2 e 8 após o início da lactação. Os níveis de progesterona observados foram inferiores aos obtidos no leite de vacas cíclicas. Dados similares foram reportados por Erb, *et al.* (1976), que também demonstraram que os níveis de estradiol no leite estão dentro da normalidade dois dias após o início da lactação, demonstrando que o leite produzido não oferece risco ao consumidor quanto aos níveis desses esteroides.

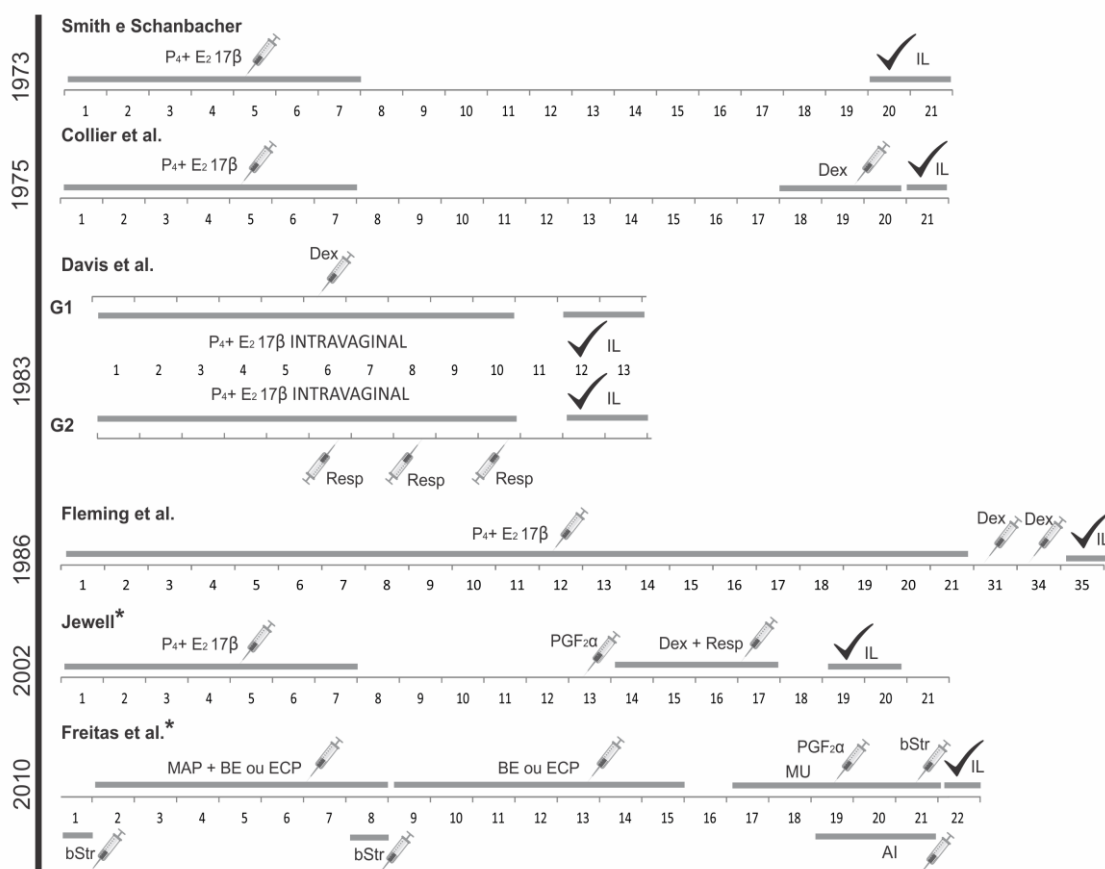


Figura 1. Evolução dos protocolos de indução da lactação. P₄= Progesterona; E₂ 17β= Estradiol 17β; Dex= Dexametasona; IL= Início da Lactação; PGF_{2α}= Prostaglandina 2α; Resp= Reserpine; bStr= Somatotropina bovina recombinante; MU= Massagem de Úbere; AI= acetato de Isoflupredona. G1e G2: foram comparados dois grupos com aplicação de dexametasona ou reserpine. *Os protocolos preconizam injeções de bStr a cada 14 dias.

Efeito dos protocolos de indução da lactação sobre a fertilidade

Além de possibilitar lactação na ausência de gestação, o protocolo hormonal utilizado para a indução possibilita que algumas vacas retornem à reprodução. Há relatos de vacas repetidoras de serviço que apresentavam cistos ovarianos, metrite, histórico de aborto e outros transtornos, que tornaram-se gestantes após submetidas ao protocolo de indução, evitando, assim, o descarte precoce (Smith e Schanbacher, 1973; Jewell, 2002; Freitas *et al.*, 2010; Mellado *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado no Brasil, que utilizou vacas Holandesas com problemas reprodutivos, 41,4% (12/29) das fêmeas se tornaram gestantes após serem submetidas a protocolos de indução, embora apenas oito mantiveram a gestação a termo (Freitas *et al.*, 2010). Jewell (2002) obtiveram 66% de prenhez (21/32) em vacas repetidoras de serviço após serem submetidas a protocolo de indução da lactação. Em outro estudo utilizando 98 vacas induzidas artificialmente, que falharam em conceber anteriormente, não foi observada diferença significativa na taxa de prenhez em comparação com 81 vacas paridas (71% vs. 75% de prenhez, respectivamente) (Mellado *et al.*, 2006). Especula-se que o longo período de exposição ao estrógeno module os mecanismos de defesa uterina, favorecendo a recuperação endometrial. Ainda, a completa regressão folicular promovida durante o período de administração concomitante de progesterona e estradiol, levando à ausência de estruturas ovarianas por cerca de 30 dias (Sawyer *et al.*, 1986; Freitas *et al.*, 2010), poderia renovar a população de folículos antrais, contornando

eventuais transtornos ovarianos.

Em um estudo utilizando 30 novilhas submetidas a diferentes protocolos de indução da lactação, aproximadamente 90% das fêmeas conceberam em até 90 dias após o tratamento, demonstrando que as alterações na função reprodutiva causadas pela administração hormonal são contornáveis (Sawyer *et al.*, 1986). Dados similares foram relatados por Macrina, Kauf, *et al.* (2011), que induziram a lactação em 32 novilhas da raça Holandês aos 15 meses de idade, sendo que 88% pariram aos 27 meses, iniciando uma segunda lactação natural.

Cabe ressaltar que os efeitos sobre a fertilidade são especulativos, uma vez que os estudos não apresentam grupos controle e a restauração da fertilidade pode ser espontânea. Portanto, a hipótese de que a indução pode contribuir na restauração da fertilidade de fêmeas bovinas se os mecanismos desse suposto efeito ainda devem ser investigados. Por outro lado, os estudos realizados com novilhas demonstram claramente que os hormônios utilizados no protocolo de indução não afetam negativamente a reprodução.

Limitações, perspectivas e alternativas

Analisando os protocolos descritos na Fig. 1, pôde-se notar que o elevado número de manejos com os animais é um grande inconveniente. Além disso, o grande volume de preparações hormonais (em determinados momentos, até 30 a 40 ml diariamente) gera desconforto nas vacas e pode induzir reações no local das injeções.

Outra grande desvantagem dos protocolos citados está relacionada ao longo período de estro apresentado pelas vacas induzidas, o que pode predispor à fratura de pelve, torção de tendão e relaxamento de ligamentos das vértebras, resultando em paralisia dos membros posteriores e até na morte ou no sacrifício dos animais (Chakriyarat *et al.*, 1978). A manifestação de estro não ocorre apenas durante o período de tratamento, perdurando até mesmo após o início da lactação. Obviamente, a diminuição da dose de estradiol utilizada minimiza o comportamento de estro anormal, mas pode comprometer a resposta ao protocolo (Sawyer *et al.*, 1986).

Uma alternativa para a solução desses problemas poderia ser a utilização de acetato de medroxiprogesterona (MAP), uma vez que Freitas *et al.* (2010) não detectaram animais em estro quando utilizaram esse progestágeno sintético pela via parenteral em substituição à P4. Além disso, não está clara a real necessidade de aplicação de E2 na ausência de P4, uma vez que os protocolos iniciais obtinham boa produção aplicando apenas P4 e E2 simultaneamente durante todo o protocolo (Smith e Schanbacher, 1973; Jewell, 2002). Também poderiam ser aprimorados protocolos curtos com a utilização de implantes intravaginais, contendo P4 e E2, o que minimizou a manifestação de estro nas vacas e ainda proporcionou a antecipação da lactação em aproximadamente 7 dias (Fig. 1; (Davis *et al.*, 1983). Outra alternativa seria investigar a viabilidade de utilizar menores níveis de E2, já que a dose não parece tão determinante para o sucesso da indução (Smith e Schanbacher, 1974), embora doses muito baixas (5 mg de BE associado a 200mg de P4 a cada três dias, por 30 dias) sejam ineficientes na indução, independentemente da utilização de PGF, ocitocina e dexametasona (Sawyer *et al.*, 1986). Conforme proposto por Sawyer *et al.* (1986), a chave para a evolução dos protocolos está em encontrar doses mínimas de hormônios que sejam adequadas para indução satisfatória, porém com poucos efeitos colaterais.

Quanto ao bem-estar animal, até o presente momento, não há dados de literatura mensurando o grau de desconforto proporcionado pela indução da lactação. Recentemente, realizou-se um experimento em que foi acompanhado diariamente o comportamento das fêmeas e coletadas amostras de sangue para mensuração de marcadores de inflamação bem como mensuração da temperatura no local das injeções i.m. (dados não publicados). Esperava-se uma modulação de marcadores metabólicos e de resposta inflamatória nas vacas

induzidas em comparação às fêmeas-controle, entretanto, isso não foi observado. Na termografia, esperava-se um aumento de temperatura na região da aplicação dos hormônios no grupo induzido, o que não se confirmou. Apesar de os dados coletados até o presente momento não indicarem um processo inflamatório intenso, pôde-se observar que a manifestação de estro é o principal problema a ser contornado para minimizar o desconforto dos animais. Esse período de estro prolongado pode levar a uma menor ingestão de alimento, o que pode resultar em um menor desempenho produtivo das vacas induzidas. Conforme descrito por Chakriyaratet al. (1978), se não forem adotadas medidas de manejo para proteção dos animais em estro, durante e após o protocolo de indução, é possível que algumas vacas apresentem lesões e fraturas devido às montas frequentes realizadas pelas outras vacas.

Com base no acima exposto, fica evidente que a técnica de indução artificial da lactação tem muito a evoluir. A utilização de preparações de hormônios mais concentradas e com longa ação poderia minimizar o volume a ser administrado e o número de manejos, respectivamente, simplificando o protocolo. Outra alternativa seria a utilização de implantes de liberação lenta. Para minimizar a manifestação de estro, a não aplicação do E2 isoladamente (apenas simultâneo à aplicação de P4) e a aplicação de doses menores de E2 podem surgir como alternativa, embora novos protocolos tenham que ser desenvolvidos. A evolução da técnica poderia repercutir em uma maior adoção por parte dos produtores, diminuindo o descarte precoce de fêmeas de alto potencial genético.

Considerações finais

O conhecimento da fisiologia da gestação, especialmente do perfil endócrino, possibilitou o desenvolvimento de protocolos de indução artificial. Usando como base a P4 e o E2 é possível obter lactação em vacas e novilhas, porém alguns pontos ainda devem ser melhorados.

É necessário melhorar a resposta dos animais submetidos ao protocolo, uma vez que há variabilidade de resposta e de produção leiteira. Outro ponto a ser aprimorado é o número de manejos, pois as vacas induzidas são diariamente manejadas, o que é indesejado frente à escassez cada vez maior de mão de obra. O longo período de estro apresentado pelas vacas submetidas ao protocolo é, provavelmente, o principal ponto a ser melhorado.

Referências

- Bauman D.** Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest Anim Endocrinol*, v.17, p.101-116, 1999.
- Chakriyarat S, Head H, Thatcher W, Neal F, Wilcox C.** Induction of lactation: Lactational, physiological, and hormonal responses in the bovine. *J Dairy Sci*, v.61, p.1715-1724, 1978.
- Collier RJ, Bauman DE, Hays RL.** Effect of reserpine on milk production and serum prolactin of cows hormonally induced into lactation. *J Dairy Sci*, v.60, p.896-901, 1977.
- Collier RJ, Bauman DE, Hays RL.** Milk production and reproductive performance of cows hormonally induced into lactation. *J Dairy Sci*, v.58, p.1524-1527, 1975.
- Davis SR, Welch RAS, Pearce MG, Peterson AJ.** Induction of lactation in nonpregnant cows by estradiol-17 β and progesterone from an intravaginal sponge. *J Dairy Sci*, v.66, p.450-457, 1983.
- Erb RE.** Harmonal control of mammatogenesis and onset of lactation in cows: a review. *J Dairy Sci*, v.60, p.155-169, 1977.
- Erb RE, Monk EL, Mollett TA, Malven PV, Callahan CJ.** Estrogen, progesterone, prolactin and other changes associated with bovine lactation induced with estradiol-17 β and progesterone. *J Anim Sci*, v.42, p.644-654, 1976.
- Fleming JR, Head HH, Bachman KC, Becker HN, Wilcox CJ.** Induction of lactation: histological and biochemical development of mammary tissue and milk yields of cows injected with estradiol-17 β and progesterone for 21 days. *J Dairy Sci*, v.69, p.3008-3021, 1986.
- Freitas, PRC, Coelho, SG, Rabelo E, Lana ÂMQ, Artunduaga MAT, Saturnino HM.** Artificial induction of lactation in cattle. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.2268-2272, 2010.
- Jewell T.** Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows. 2002, 47f. Dissertation (Master of Science -

DairyScience) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, 2002.

Jones RD, Mizinga KM, Thompson FN, Stuedemann JA, Bowen JM. Bioavailability and pharmacokinetics of metoclopramide in cattle. *J Vet Pharmacol Ther*, v.17, p.141-147, 1994.

Macrina AL, Kauf ACW, Kensinger RS. Effect of bovine somatotropin administration during induction of lactation in 15-month-old heifers on production and health. *J Dairy Sci*, v.94, p.4566-4573, 2011a.

Macrina AL, Tozer PR, Kensinger RS. Induced lactation in pubertal heifers: efficacy, response to bovine somatotropin, and profitability. *J Dairy Sci*, v.94, p.1355-1364, 2011b.

Magliaro A, Kensinger R, Ford S, O'Connor M, Muller L, Graboski R. Induced lactation in nonpregnant cows: Profitability and response to bovine somatotropin. *J Dairy Sci*, v.87,p.3290-3297, 2004.

Malpress F. Experimental induction of lactation. *Br Med Bull*, v.5, p.161-163, 1947.

Mellado J, Sepulveda E, Garcia JE, Rodriguez A, De Santiago MA, Veliz FG, Mellado M. Milk yield of holstein cows induced into lactation twice consecutively and lactation curve models fitted to artificial lactations. *J Integr Agric*, v.13, p.1349-1354, 2014.

Mellado M, Antonio-Chirino E, Meza-Herrera C, Veliz FG, Arevalo JR, Mellado J, de Santiago A. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci*, v.94, p.4524-4530, 2011.

Mellado M, Nazarre E, Olivares L, Pastor F, Estrada A. Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. *Anim Sci*, v.82, p.555-559, 2006.

Narendran R, Hacker RR, Batra TR, Burnside EB. Hormonal induction of lactation in the bovine: mammary gland histology and milk composition. *J Dairy Sci*, v.57, p.1334-1340, 1974.

Sawyer G, Fulkerson W, Martin G, Gow C. Artificial induction of lactation in cattle: initiation of lactation and estrogen and progesterone concentrations in milk. *J Dairy Sci*, v.69, p.1536-1544, 1986.

Smith KL, Schanbacher FL. Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17 β -estradiol and progesterone1. *J Dairy Sci*, v.56, p.738-743, 1973.

Smith KL, Schanbacher FL. Hormone induced lactation in the bovine. II. Response of nulligravida heifers to modified estrogen-progesterone treatment. *J Dairy Sci*, v.57, p.296-303, 1974.

Tucker H. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J Dairy Sci*, v.83, p.874-884, 2000.

Tucker HA. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: a review. *J Dairy Sci*, v.70, p.1958-1966, 1987.

Walker SM, Stanley AJ. Effect of diethylstilbestrol dipropionate on mammary development and lactation. *Exp Biol Med*, v.48, p.50-53, 1941.

2.2 Artigo 2

Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios e de estresse

H.S. Pestano, S.F. Vargas Jr, C.S. Haas, F.C. Oliveira, A.D. Vieira, R.G. Mondadori, A. Schneider, T. Lucia Jr, L.M.C. Pegoraro, B.G. Gasperin

Artigo será submetido a Revista Brasileira de Reprodução animal

Indução da lactação em vacas: perfil endócrino e de marcadores inflamatórios

Lactation inducton in cows: inflammatory markers and encocrine profile

H.S. Pestano, S.F. Vargas Jr, C.S. Haas, F.C. Oliveira, A.D. Vieira, R.G. Mondadori, A. Schneider, T. Lucia Jr, L.M.C. Pegoraro, B.G. Gasperin¹

Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Reprodução Animal (ReproPEL), Capão do Leão, RS, Brasil.

¹Correspondência: bggasperin@gmail.com

Resumo

Os protocolos de indução artificial da lactação (IAL) evoluíram pouco nas últimas décadas e, apesar de eficientes, apresentam diversas limitações devido ao elevado número de aplicações hormonais parenterais e prolongado período de estro. Este estudo teve por objetivo determinar alterações em marcadores de resposta inflamatória e de estresse em vacas submetidas a IAL. Ainda, objetivou-se traçar o perfil endócrino de animais submetidos a um protocolo convencional de IAL e investigar alternativas para substituir aplicações parenterais de P4 pela via vaginal. No experimento 1, onze vacas Jersey foram divididas nos grupos induzido (IND; n=5), submetido a administração diária i.m. de progesterona (P4; 0,25 mg/kg; dias 0 a 6) e de benzoato de estradiol (E2; 0,1mg/kg; dias 0 a 13); e grupo controle (CONT; n=6), cujas vacas receberam um dispositivo vaginal contendo 1g de progesterona durante 14 dias. As fêmeas submetidas ao protocolo de indução apresentaram desenvolvimento da glândula mamária e manifestação de estro por cerca de 12 dias, a partir do dia 9. Através da termografia, não foram observadas diferenças de temperatura no local da administração dos hormônios ($P>0,05$) em relação ao grupo CONT. Os níveis de paraoxonase 1 (PON1), cortisol, colesterol e albumina não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). Os níveis de proteína sérica total foram inferiores no grupo IND ($P<0,05$). Em relação ao perfil endócrino, no D0 as fêmeas apresentavam $51,9\pm 16$ pg/ml de estradiol e, após o início do tratamento, acima de 2000pg/ml. Os níveis de progesterona das vacas IND no D4 ($9,4\pm 1,6$ ng/ml) foram significativamente superiores aos observados no mesmo momento nas vacas CON ($4,2\pm 0,3$ ng/ml). No experimento 2, os grupos que receberam DIVs contendo 1 (n=3), 1,9 (n=4) ou 3,8g (n=3) de P4, apresentaram níveis séricos de $2,5\pm 0,3$, $3,7\pm 0,5$ e $6,6\pm 1,2$ ng/ml de P4, 48h após a inserção, respectivamente. Conclui-se que o manejo e as injeções de hormônios dos protocolos de IAL não promovem, estresse e reação inflamatória significativa, embora o longo período de estro dificulte o manejo com os animais. O perfil endócrino observado possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias para IAL.

Palavras-chave: lactação, esteroides, estresse, cortisol, vacas.

Abstract

Artificial lactation induction (ALI) protocols have evolved little in the last decades and, although efficient, present several limitations due to the high number of parenteral hormonal applications and prolonged estrus period. This study aimed to determine the inflammatory response and alterations in stress markers in cows submitted to ALI. Also, the objective was to trace the endocrine profile of animals submitted to a conventional ALI protocol and to investigate alternatives to replace parenteral P4 applications by the vaginal route. In experiment 1, eleven Jersey cows were divided into the induced group (IND; n = 5), dosed daily with i.m. progesterone (P4, 0.25 mg / kg, days 0 to 6) and estradiol benzoate (E2, 0.1 mg / kg, days 0 to 13); and the control group (CONT; n = 6), whose cows received a vaginal device containing 1g progesterone for 14 days. The females submitted to the induction protocol presented development of mammary gland and estrus manifestation for about 12 days, starting on day 9. Thermography showed no differences in temperature at the site of hormone administration ($P > 0.05$) in relation to the CONT group. The levels of paraoxonase 1 (PON1), cortisol, cholesterol and albumin did not differ between groups. Total serum protein levels were lower in the IND group ($P < 0.05$). Regarding the endocrine profile, in the D0, females presented around 50pg / ml and, after the beginning of the treatment, above 2000pg / ml estradiol. Concerning progesterone, during the application period (D2 and D4) the induced cows presented serum progesterone above 9ng / ml, returning to basal levels in D12. In the experiment 2, groups 1, 2 and 3 presented levels of 2.5 ± 0.3 , 3.7 ± 0.5 and 6.6 ± 1.2 ng / ml P4, 48 h after insertion of a vaginal device containing 1g (n = 3), 1.9g (n = 4) and 3.8g (n = 3) of P4, respectively. It is concluded that the management and the injections of hormones of the ALI protocols do not promote discomfort, stress and significant inflammatory reaction, being the long period of estrus manifestation an important undesirable factor. The endocrine profile observed in the present study will allow the development of new strategies for ALI.

Keywords: Lactation, steroids, stress, cortisol, cows.

Introdução

Alterações no metabolismo geradas pelo processo de seleção de animais com alta capacidade de produção de leite, induziram a aumento no intervalo parto concepção e, conseqüentemente, no intervalo entre partos. Como a lactogênese está associada ao estímulo endócrino gerado durante a etapa final da gestação, o comprometimento na atividade reprodutiva gera prejuízo econômico pela redução na produção de leite e aumento no descarte de animais. Estima-se que problemas reprodutivos são a causa de 27,7% dos descartes em rebanhos leiteiros (Silva *et al.*, 2008). Como alternativa, existe a possibilidade de indução de lactação mediante a mimetização do perfil endócrino do periparto através da aplicação de hormônios exógenos. Com esta técnica é possível a obtenção de resposta em 80-90% dos animais, atingindo uma produção de 65-80% da expectativa do volume de leite produzido em uma lactação natural (Freitas, *et al.*, 2010). Além da produção de leite, também tem sido reportado um efeito de recuperação de fertilidade em animais submetidos ao tratamento de indução (Smith e Schanbacher, 1973; Jewell, 2002; Freitas, *et al.*, 2010; Mellado *et al.*, 2011), caracterizando um efeito terapêutico secundário.

Apesar das vantagens supracitadas, a técnica de indução da lactação deve ser melhor estudada, pois envolve vários manejos, o que pode causar estresse e desconforto nos animais (Ferreira *et al.*, 2012). O protocolo envolve aplicações de grandes volumes de hormônios, diluídos em veículo oleoso e administrados por via intramuscular (i.m), podendo ocasionar lesões no local da aplicação, as quais poderiam ser identificadas através da termografia (Stewart *et al.*, 2005; Basile *et al.*, 2010) e pelos níveis de paraoxonase (Gruys *et al.*, 2005) e albumina (Bionaz *et al.*, 2007).

Além das aplicações hormonais, também é realizada massagem no úbere, tendo assim, manejo por mais cinco dias, sendo este mais um fator predisponente ao estresse dos animais

(Ferreira *et al.*, 2012). Além disso, a administração isolada do estradiol (E2) faz com que as fêmeas apresentem comportamento de estro por vários dias, o que predispõe a claudicações e fraturas, que eventualmente podem levar a morte dos animais (Chakriyarat *et al.*, 1978). Uma das formas de avaliar o estresse animal é a mensuração do nível de cortisol (Stott, 1981; Cooper *et al.*, 1995), que aumenta consideravelmente quando o animal é exposto a agentes estressores. Manejos rotineiros como palpação retal, orquiectomia e transporte desencadeiam estresse nos bovinos (Mellor e Stafford, 2000; De Oliveira Paes *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2012); entretanto, não há relatos na literatura sobre o possível desconforto e o estresse causado pelo protocolo de indução artificial da lactação.

Além das questões relacionadas ao bem-estar animal, os protocolos de IAL apresentam uma limitação relacionada ao número de manejos necessários para a administração de hormônios. Ao nosso conhecimento, há apenas alguns relatos dos níveis circulantes de progesterona e estrógeno durante um protocolo de IAL sendo que, neste último caso, há apenas os níveis circulantes após administração de estradiol 17 β (Erb, *et al.*, 1976), um esteroide de meia-vida curta e não disponível comercialmente no Brasil. Uma vez que a mão-de-obra tem se tornado um grande entrave na pecuária, alternativas aos regimes tradicionais de aplicação hormonal, explorando a meia-vida dos hormônios disponíveis e diferentes vias de administração, são necessárias.

O presente estudo tem o intuito de fornecer subsídio para a elaboração de protocolos mais simples, economicamente mais rentáveis, e que causem menor desconforto aos animais. Portanto, objetivou-se: avaliar alterações provocadas pelo protocolo hormonal e pelo longo período de estro através da mensuração de marcadores de resposta inflamatória e estresse; determinar o perfil endócrino de progesterona e estradiol em vacas submetidas a um protocolo de indução da lactação; determinar os níveis séricos de progesterona após administração de diferentes doses intravaginal, fornecendo subsídios para a elaboração de formas alternativas

para a indução da lactação.

Materiais e métodos

Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA-UFPEL) – processo 23110.010524/2014-71.

Experimento 1

Todos os animais foram mantidos em campo nativo com água *ad libitum*. Foram utilizadas 11 vacas da raça Jersey, com peso médio de 482 kg (variando entre 444 e 513 kg), não gestantes e não lactantes, as quais foram previamente sincronizadas com duas aplicações de prostaglandina (150 µg- Cloprostenol – i.m, Prolise®) para eliminar os possíveis corpos lúteos funcionais e evitar a influência da progesterona endógena no início do estudo. As vacas do grupo controle (CONT; n=6) receberam apenas um implante vaginal contendo 1g de progesterona, sendo o mesmo substituído por um novo 7 dias após, totalizando 14 dias de exposição. Esse tratamento de 14 dias foi estabelecido para evitar que os animais manifestassem estro, a fim de reduzir o risco de lesões. Fêmeas do grupo induzido (IND; n=5), foram submetidas a um protocolo que iniciou com a administração i.m. diária de progesterona (P4; 0,25 mg/kg, Fagron®) e benzoato de estradiol (BE; 0,1mg/kg, Fagron®) durante sete dias (D0 a D6), seguido de administração de BE isoladamente (0,1mg/kg) por mais 7 dias (D7 a D13). Além disso, vacas do grupo IND receberam três aplicações i.m. de dexametasona (0,05mg/kg; D19 a D21) e uma aplicação i.m. de prostaglandina F2α (150µg de cloprostenol sódico; D17). Para que ocorresse a liberação de prolactina endógena, as vacas tiveram os úberes massageados duas vezes ao dia durante 5 minutos (D13 a D19). Durante todo o protocolo foi realizada observação diária de estro nos momentos anteriores aos manejos do protocolo.

Avaliações realizadas

Foram realizados termogramas diários, do dia 0 a 16 do protocolo, do membro posterior esquerdo, nos pontos de injeção dos hormônios, para determinar possíveis reações inflamatórias locais. Também foram realizados termogramas dos cascos, para identificar possíveis lesões por hiperatividade. A termografia foi realizada com o uso do termógrafo FLIR E25 (FLIR®, EUA). Os termogramas de cada ponto avaliado foram analisados pelo software específico (FLIR QuickReport™ PC software), para determinação das temperaturas.

Coletas de sangue por venopunção coccígea foram realizadas usando sistema a vácuo nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 do protocolo de indução. Os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por cinco minutos para acelerar a separação do soro para seu armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), até o momento das avaliações. Foram determinados os níveis séricos de albumina, proteína total e colesterol total pelo método enzimático-colorimétrico (oxidase/peroxidase) automatizado. As quantificações foram realizadas por espectrofotometria, utilizando o aparelho Labmax Plenno (Labtest Diagnóstica®). Os níveis séricos de cortisol, progesterona e estradiol, foram determinados por eletroquimioluminescência e os da proteína de fase aguda negativa paraoxonase (PON1) por espectrofotometria (Browne *et al.*, 2007).

Experimento 2

Este experimento foi delineado para investigar a possibilidade de utilização da via vaginal para administração de progesterona em protocolos de indução de lactação. Foram utilizadas 10 vacas Jersey, com peso médio de 473,5 kg (variando entre 420 e 509 kg), as quais receberam duas aplicações de prostaglandina (150 µg- Cloprostenol – i.m, Prolise®) nos dias -5 e 0, para que não possuíssem corpos lúteos funcionais no início do estudo. Ainda no dia zero, folículos maiores que 8mm foram aspirados. Os animais foram divididos em três grupos: grupo 1 (n=3), que recebeu 1g de P4 através de um dispositivo vaginal (DIV; DIB®); grupo 2 (n=4), que recebeu 1,9g de P4 através de um DIV (CIDR®) e grupo 3 (n=3), que recebeu 3,8g de P4 através de dois DIV's contendo 1,9g de P4 cada (2 CIDR®). Foram feitas coletas de sangue a

cada 24h até 60h e no dia sete após a aplicação do DIV, para verificar o nível de progesterona que os animais apresentavam.

Análise estatística

Os dados contínuos foram testados quanto à normalidade e transformados, quando necessário. A análise do efeito dos tratamentos sobre os níveis de marcadores séricos, a temperatura e os níveis de progesterona e estrógeno foi analisado utilizando modelo para dados repetidos (MIXED models) no software SAS (SAS Institut Inc., Cary, NC). Em todas as análises, o nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Todas as fêmeas submetidas ao protocolo de indução responderam ao tratamento, sendo observado o desenvolvimento da glândula mamária e secreção láctea, embora a produção de leite após o início da ordenha não tenha sido avaliada. Todos os animais do grupo IND apresentaram estro a partir do D9 (dois dias após o término da administração de progesterona), com a duração de, aproximadamente, 12 dias.

No presente estudo, não se verificou diferença estatística de temperatura no local da administração dos hormônios nos primeiros sete dias do protocolo. Apesar de não haver diferença entre os grupos, observou-se um efeito do momento, sendo registradas menores temperaturas entre o D2 e D5 (Figura 1A).

Quanto à temperatura dos cascos, no D11 os animais do grupo IND apresentaram uma temperatura inferior aos animais do grupo controle ($P < 0,05$). Nos D14 e D16, observou-se uma maior temperatura nos cascos dos animais do grupo IND em relação ao controle (Figura 1B).

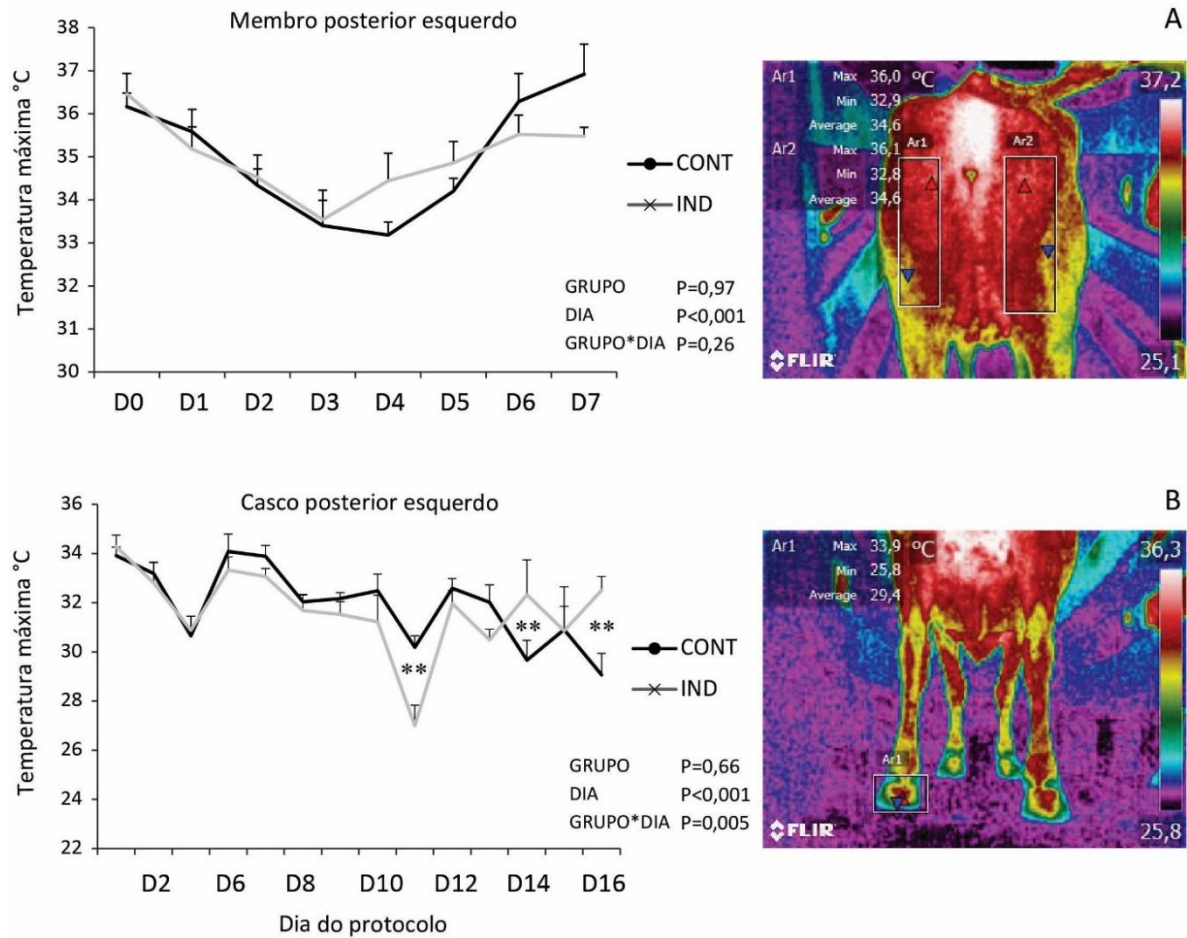
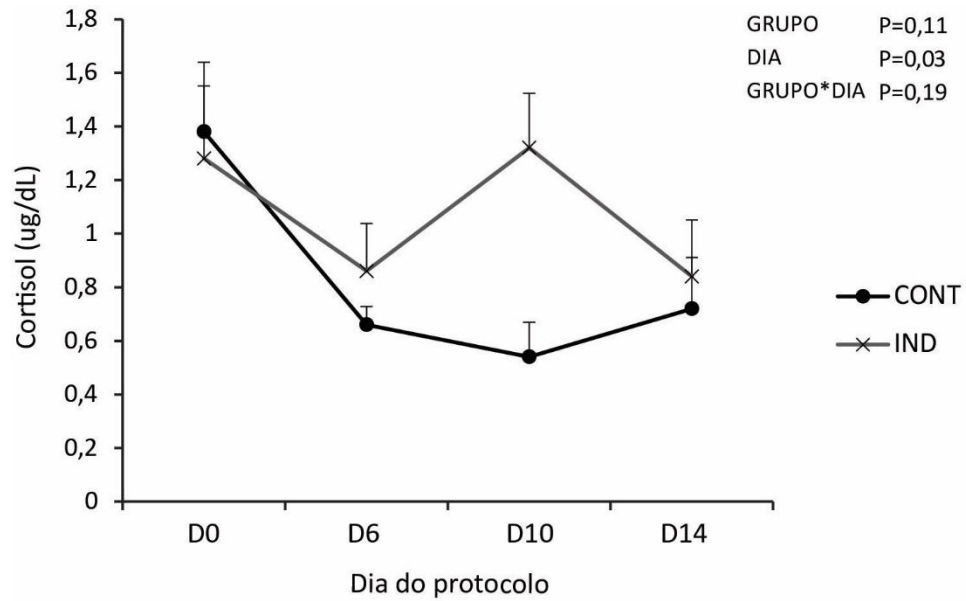


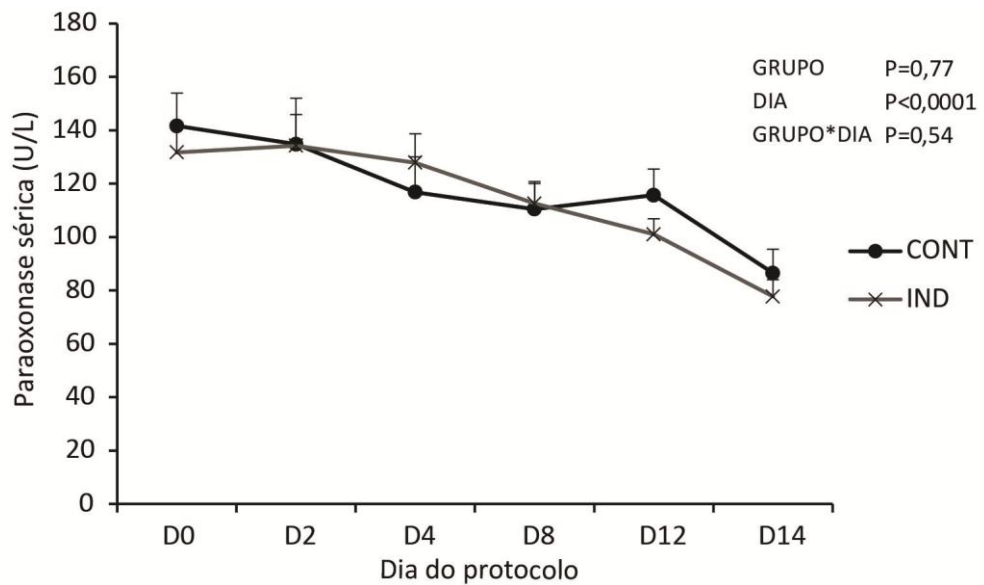
Figura 1: A) Temperatura do membro posterior esquerdo dos animais do grupo controle e grupo induzido. B) Temperatura do casco posterior esquerdo dos animais do grupo controle e grupo induzido. ** representa diferença significativa entre os grupos em determinado momento.

Em relação ao cortisol, não foram observadas diferenças significativas, apenas valores mais elevados no início do protocolo em ambos os grupos (Figura 2). Os níveis de PON1, não diferiram entre os grupos controle e IND. Observou-se somente um efeito do momento no D4 e D12 (Figura 3). Também não foi observado efeito significativo do tratamento, do momento e da interação momento tratamento nos níveis de colesterol e albumina entre as vacas do grupo IND e controle (Figura 4 A e C) ($P>0,05$). Os níveis de proteína sérica total diferiram entre os grupos, sendo observados níveis inferiores no grupo IND em relação ao controle ($P<0,05$; Figura 4 B).



1

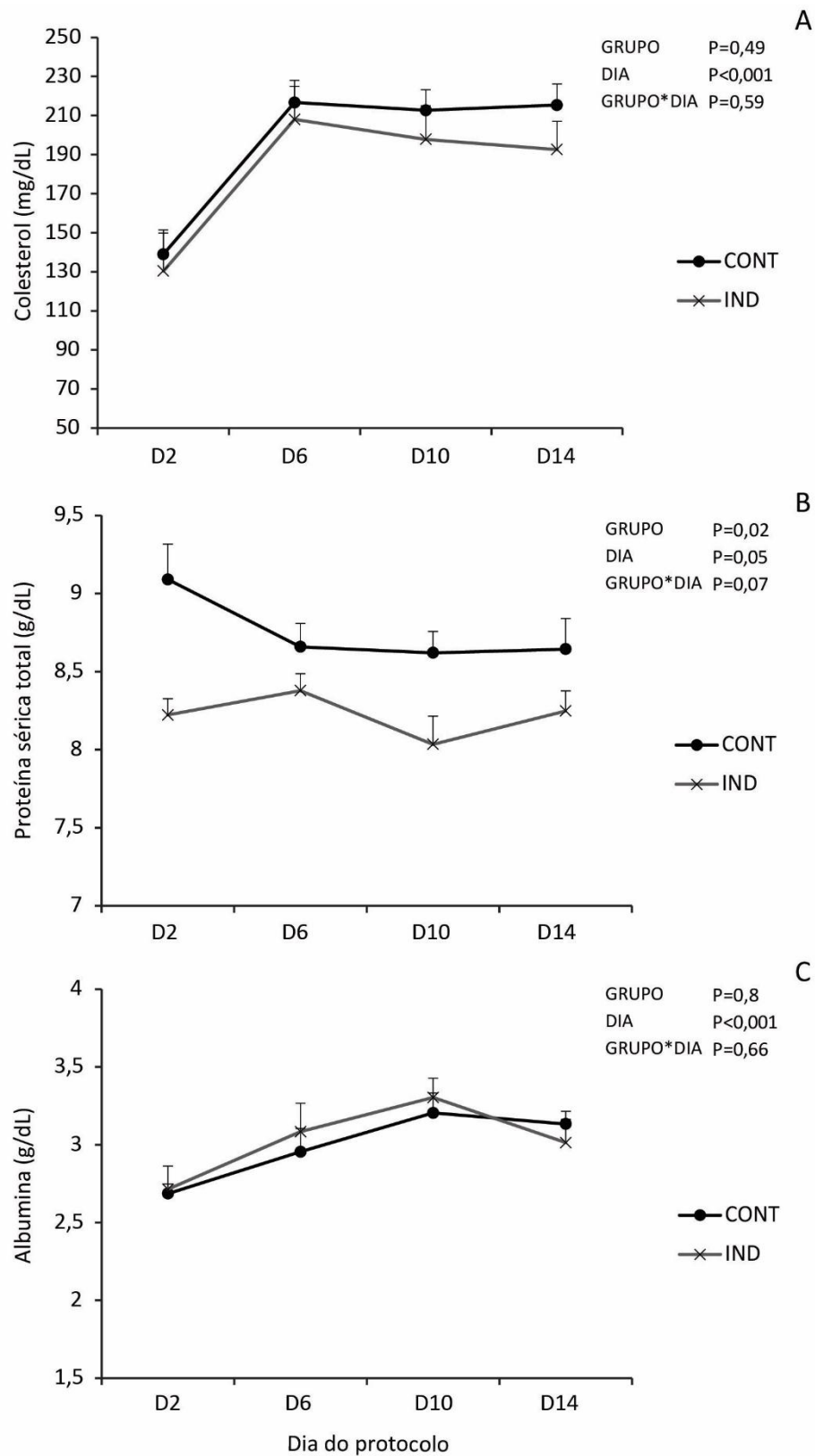
2 Figura 2: Níveis de Cortisol apresentado pelas vacas do grupo controle e grupo IND.



3

4 Figura 3: Níveis de PON1 apresentado pelas vacas do grupo controle e grupo IND.

1



2

3 Figura 4: Níveis de Colesterol (A), Proteína sérica total (B) e Albumina (C) apresentado pelas
4 vacas do grupo controle e IND.

Em relação ao perfil endócrino das vacas induzidas, no experimento 1, no D0, as fêmeas apresentavam $51,9 \pm 16$ pg/ml de estradiol e, após o início do tratamento, foram observados níveis acima de 2000 pg/ml, apresentando uma diferença estatística entre o D0 e os demais dias (D2, 4, 8 12; Figura 5). Em relação à progesterona, uma das vacas do grupo controle foi excluída do estudo por apresentar mais de 10 ng/ml de progesterona no D0, indicando a presença de corpo lúteo funcional. Todas as demais vacas apresentaram níveis inferiores a 1 ng/ml, evidenciando a ausência de atividade luteal. Durante o período de aplicação (D2 e D4) as vacas induzidas apresentaram níveis de, aproximadamente, 9 ng/ml, retornando aos níveis basais no D12 (quatro dias após o término das injeções i.m.). As fêmeas do grupo controle, que receberam um dispositivo vaginal contendo 1g de progesterona, apresentaram níveis entre $5,8 \pm 0,7$ e $4,2 \pm 0,3$ ng/ml entre D2 e D4. Os níveis séricos de progesterona diferiram entre os grupos no D4 e D12 (Figura 6).

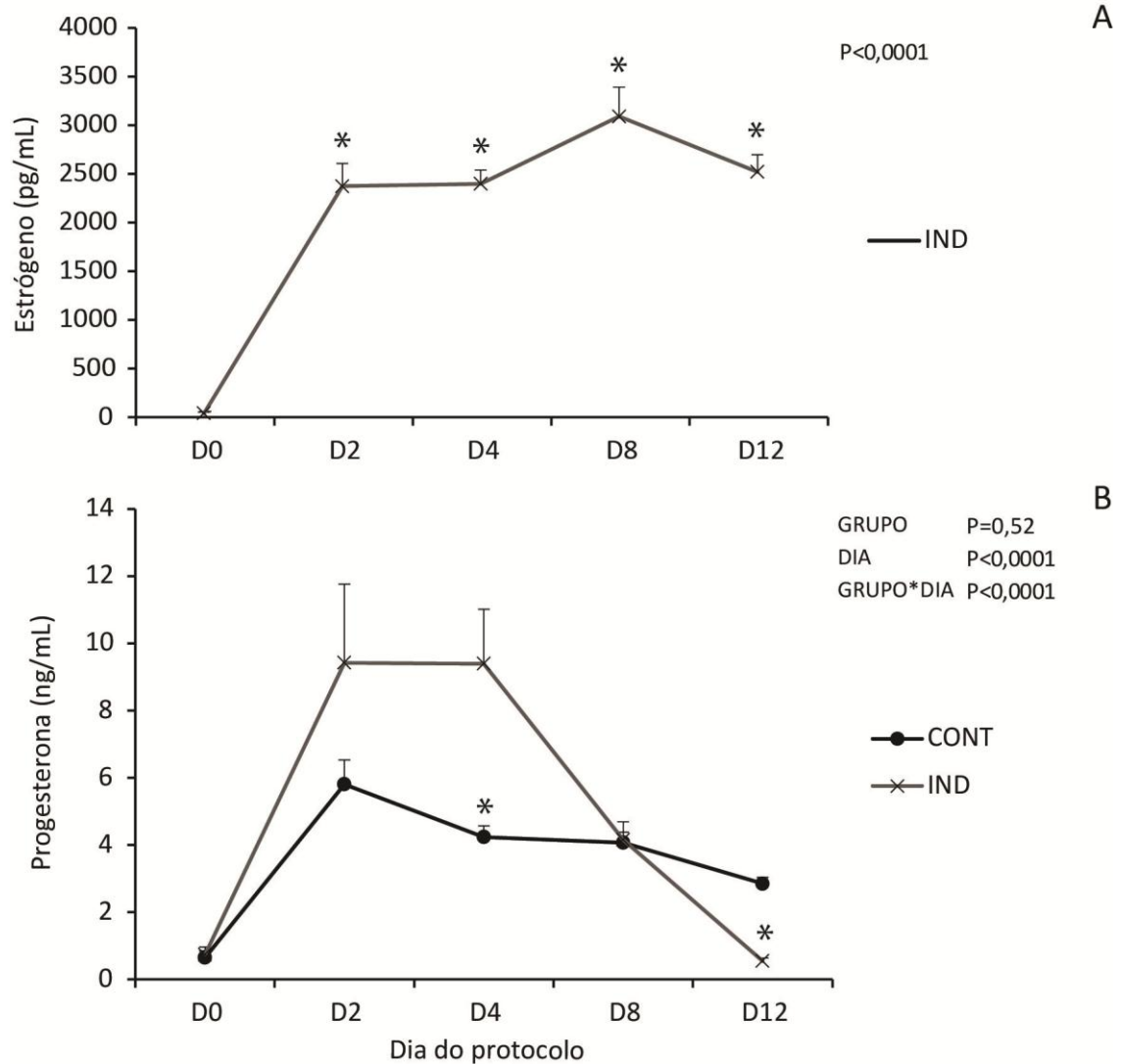


Figura 5: Níveis de estrógeno (A) e progesterona (B) dos animais do grupo controle e grupo induzido (Experimento 1). * representa diferença significativa.

No experimento 2, os três grupos apresentaram um aumento nos níveis de P4, indicando a eficácia dos tratamentos. No D0 e D1, os grupos 2CIDR e 1DIB diferiram quanto aos níveis de P4, sendo observado $2,17 \pm 0,6$ e $1,07 \pm 0,1$ ng/ml no D0 e $7,75 \pm$ e $4,08 \pm$ ng/ml no D1, respectivamente. Nos momentos D2 e D7, não houve diferença entre os grupos 1CIDR e 1DIB, sendo observado $3,68 \pm 0,5$ e $2,52 \pm 0,2$ ng/ml no D2 e $3,55 \pm 0,5$ e $2,26 \pm 0,1$ ng/ml no D7, respectivamente, diferindo em relação ao grupo 2 CIDR (D2 $6,61 \pm 1,2$ e D7 $5,65 \pm 0,2$ ng/ml; Figura 6).

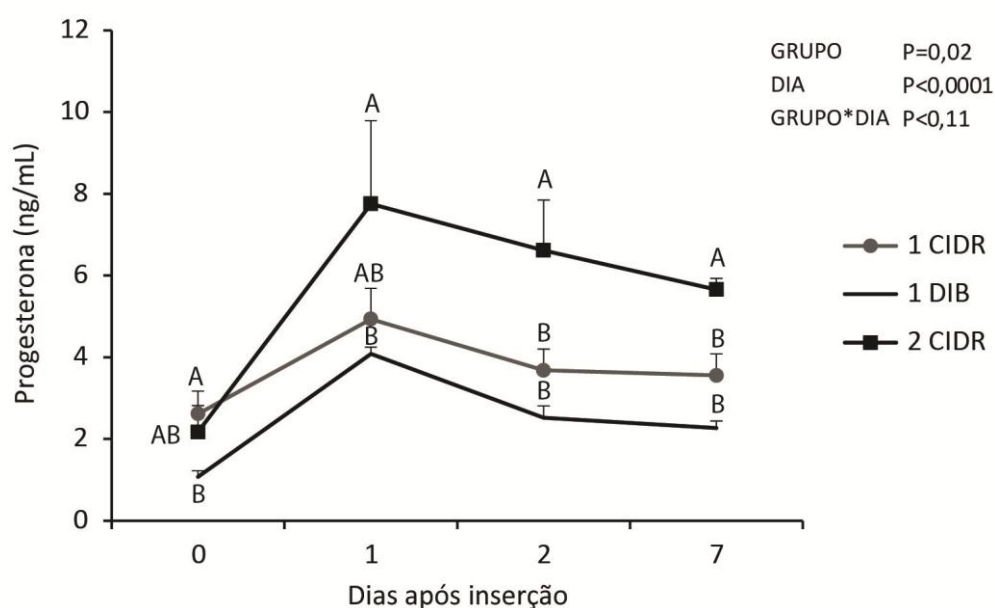


Figura 6: Níveis de Progesterona dos animais do experimento 2.

Discussão

O presente estudo teve por objetivo determinar o perfil endócrino de vacas submetidas a um protocolo de indução artificial da lactação e avaliar as possíveis lesões e o estresse provocado pelo protocolo e pelo longo período de estro através da mensuração de indicadores de resposta inflamatória e estresse. Além da determinação dos níveis de estrógeno e progesterona de um protocolo tradicional, os principais achados foram: as repetidas administrações de grandes volumes de hormônios não induzem uma reação inflamatória significativa em vacas submetidas à indução da lactação; apesar de não ter sido observada diferença significativa nos níveis de cortisol, os principais transtornos observados durante o protocolo foram os manejos diários e o longo período de estro dos animais; os níveis de progesterona proporcionados por DIVs sugerem a possibilidade de utilização da via vaginal em substituição à via parenteral em protocolos de IAL.

Atualmente não há estudos mensurando o grau de desconforto dos animais submetidos ao protocolo de indução da lactação. Um dos potenciais efeitos adversos do protocolo está relacionado à reação no local das múltiplas injeções de grandes volumes de hormônios, o que pode ser mensurado através da termografia. Oscilações na temperatura corporal estão associadas a inúmeras lesões, doenças ou mesmo alterações comportamentais (Stewart *et al.*, 2005; Redaelli *et al.*, 2014). Entretanto, no presente estudo não se verificou diferença de temperatura no local da administração dos hormônios, sugerindo que não tenha ocorrido uma resposta inflamatória exacerbada nos locais onde eram realizadas as injeções. De fato, não foram observadas reações significativas como abscessos ou aumento de volume nos locais onde foram realizadas as administrações. O aumento da temperatura dos cascos do membro posterior esquerdo, das vacas do grupo IND, nos dias 14 e 16 do protocolo, pode ser atribuído à alterações vasculares, pelos elevados níveis de estradiol, embora também possa ser devido a maior atividade dos animais, causada pelo estro (Stewart *et al.*, 2005).

Cortisol é liberado quando o animal é exposto à uma situação adversa como, descorna, orquiectomia e transporte (Cooper *et al.*, 1995; Mellor e Stafford, 2000; Knights e Smith, 2007; De Oliveira Paes *et al.*, 2012), sendo muito utilizado como indicador de estresse. No presente estudo não foi observada diferença nos níveis circulantes de cortisol entre os grupos, apenas maiores níveis no início do experimento. Isso também foi observado por Ferreira *et al.* (2012) quando compararam níveis de cortisol de animais submetidos a palpação retal diária e semanal, sendo que os autores sugerem que os animais se adaptam ao manejo diário. Portanto, os resultados do cortisol sugerem que os animais submetidos ao protocolo de indução da lactação praticamente não sofrem estresse significativo. Cabe salientar que todo o manejo foi realizado de forma racional, sendo que em condições de campo a resposta dos animais dependerá da forma como os mesmos são tratados.

A albumina e PON1 são proteínas de fase aguda negativa, sendo que ocorre uma redução de seus níveis durante uma resposta inflamatória (Gruys *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2013) e, segundo Bionaz *et al.* (2007) e Turk *et al.* (2008) a atividade da PON1 está positivamente correlacionada com albumina e colesterol. Em decorrência das aplicações diárias de hormônio, com isso um possível desencadeamento de um processo inflamatório, se esperava uma queda de ambas as proteínas no grupo IND, porém houve uma redução nos níveis de PON1 e um aumento nos níveis de albumina e colesterol nos dois grupos. A queda na atividade da PON1 nos dois grupos pode ser decorrente da interação com outros fatores metabólicos ou pela alteração do manejo dos animais (Antoncic-Svetina *et al.*, 2011) e o aumento nos níveis de albumina e colesterol, junto aos demais resultados, sugerem que não houve a formação do processo inflamatório. Embora não existam marcadores específicos e fidedignos de estresse e dor (Ceciliani *et al.*, 2012), as concentrações circulantes de proteínas de fase aguda estão relacionadas com a gravidade do distúrbio e extensão do dano tecidual em animais (Murata *et al.*, 2004).

Processos inflamatórios interferem no metabolismo das proteínas, devido ao reparo tecidual, por isso a avaliação dos níveis de proteína total e albumina podem colaborar para o diagnóstico de um distúrbio inflamatório (Kaneko *et al.*, 2008). Os níveis séricos de albumina não diferiram entre os grupos, sugerindo que não houve dano tecidual a ponto de desencadear uma resposta inflamatória nas vacas submetidas ao protocolo de indução. Os níveis de proteína diferiram entre os grupos, sendo observada uma tendência para a interação entre o momento e grupo. Este resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que não foi mensurada a proteína no dia 0, antes das aplicações hormonais.

Em relação aos níveis séricos de estradiol, no experimento 1, foram observados níveis compatíveis com os previamente descritos por Erb, *et al.* (1976). Porém, os poucos estudos que realizaram dosagens hormonais utilizaram estradiol 17 β , produto não disponível

comercialmente no Brasil. Portanto, o presente estudo foi o primeiro a determinar o perfil endócrino de vacas induzidas utilizando benzoato de estradiol. Após o início do tratamento, foram observados níveis acima de 2000pg/ml de estradiol, nível equivalente aos relatados em um estudo anterior, onde foram observados níveis entre 1500 e 2000 pg/ml (Erb, *et al.*, 1976). Ainda, estes níveis são compatíveis com os observados em fêmeas bovinas no final da gestação, o que demonstra que o protocolo de indução artificial da lactação mimetiza o perfil endócrino fisiológico pré-parto (Henricks *et al.*, 1972).

Em relação à progesterona, os níveis séricos encontrados no experimento 1, serviram como referência para busca de vias alternativas de suplementação de P4, tendo em vista que não há relatos na literatura dos valores séricos de P4 em animais submetidos ao protocolo de indução utilizado no presente estudo. No experimento 2, os níveis séricos obtidos foram semelhantes aos do experimento 1 e aos encontrados por Bó *et al.* (2003); Meneghetti *et al.* (2009) utilizando dispositivos de 1g e 1,9g de P4. Sabendo os níveis sérico de P4 necessários para induzir as vacas a lactarem (valores obtidos no experimento 1) e que o corpo lúteo produz, em média, 6 ng/ml a 8 ng/ml de P4 (Mann, 2009), pode-se sugerir que as aplicações i.m. podem ser substituídas pela utilização de dispositivos intravaginais associados a presença de corpos lúteos funcionais ao longo do protocolo (Macmillan *et al.*, 1991). Isso poderia ser facilmente obtido se as vacas fossem sincronizadas e iniciarem o protocolo no dia 6 após a ovulação. Ainda, os níveis fisiológicos de progesterona nos últimos 14 dias de gestação não ultrapassam 4ng/ml (Henricks *et al.*, 1972), reforçando a hipótese de que os níveis obtidos pela via vaginal são suficientes para mimetizar o perfil pré-parto e induzir a diferenciação das células epiteliais da glândula mamária.

Conclusões

As observações do presente estudo indicam que as injeções hormonais repetidas não repercutem em uma resposta inflamatória significativa local e sistêmica. Ainda, o manejo como

um todo não induziu a um aumento significativo nos níveis de cortisol circulantes, indicando que, se bem conduzido, o protocolo não induz estresse aos animais.

O principal ponto a ser melhorado no protocolo utilizado é tentar diminuir o longo período de estro apresentado pelas vacas e diminuir o número de manejos. Com os valores de progesterona encontrados, pode-se sugerir que é possível a utilização de dispositivos intravaginais impregnados com progesterona para indução de lactação em vacas, uma vez que possibilitariam níveis séricos próximos aos obtidos através de injeções intramusculares. Ainda são necessários mais estudos para encontrar formas alternativas de administração de estradiol.

Referências bibliográficas

- ANTONCIC-SVETINA, M. et al.** Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic parameters in serum of heifers and lactating cows related to oxidative stress. *Res Vet Sci*, v. 90, n. 2, p. 298-300, Apr 2011.
- BASILE, R. et al.** Equine inflammatory process evaluation using quantitative thermografic methodology. *Ars Veterinária*, v. 26, n. 2, p. 077-081, 2010.
- BAUMAN, D.** Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domestic animal endocrinology*, v. 17, n. 2, p. 101-116, 1999.
- BIONAZ, M. et al.** Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 4, p. 1740-1750, 2007.
- BÓ, G.; BARUSELLI, P.; MARTÍNEZ, M.** Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3, p. 307-326, 2003.
- BROWNE, R. W. et al.** Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. *Clinical Chemistry*, v. 53, n. 2, p. 310-317, February 1, 2007 2007.
- CECILIANI, F. et al.** Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 7/19/ 2012.
- CHAKRIYARAT, S. et al.** Induction of lactation: Lactational, physiological, and hormonal responses in the bovine. *Journal of dairy science*, v. 61, n. 12, p. 1715-1724, 1978.

COLLIER, R.; BAUMAN, D.; HAYS, R. Milk production and reproductive performance of cows hormonally induced into lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 10, p. 1524-1527, 1975.

Collier RJ, Bauman DE, Hays RL. Effect of reserpine on milk production and serum prolactin of cows hormonally induced into lactation. *Journal of dairy science*, v. 60, n. 6, p. 896-901, 1977.

COOPER, C. et al. Cortisol, progesterone and β -endorphin response to stress in calves. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 75, n. 2, p. 197-201, 1995.

DAVIS, S. R. et al. Induction of Lactation in Nonpregnant Cows by Estradiol-17 β and Progesterone from an Intravaginal Sponge. *Journal of Dairy Science*, v. 66, n. 3, p. 450-457, 3// 1983.

DE OLIVEIRA PAES, P. R. et al. O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 305-312, 2012.

ERB, R. E. et al. Hormone induced lactation in the cow. IV. Relationships between lactational performance and hormone concentrations in blood plasma. *Journal of dairy science*, v. 59, n. 8, p. 1420-1428, 1976.

ERB, R. E. Harmonal Control of Mammogenesis and Onset of Lactation in Cows—A Review1. *Journal of Dairy Science*, v. 60, n. 2, p. 155-169, 2// 1977.

ERB, R. E. et al. Estrogen, progesterone, prolactin and other changes associated with bovine lactation induced with estradiol-17 β and progesterone. *J Anim Sci*, v. 42, n. 3, p. 644-54, Mar 1976.

FERREIRA, C. P. et al. Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. *Veterinária e Zootecnia*, v. 19, n. 3, p. 366-372, 2012.

FLEMING, J. R. et al. Induction of Lactation: Histological and Biochemical Development of Mammary Tissue and Milk Yields of Cows Injected with Estradiol-17 β and Progesterone for 21 Days1. *Journal of Dairy Science*, v. 69, n. 12, p. 3008-3021, 12// 1986.

FREITAS, P. C. R. et al. Artificial induction of lactation in cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 10, p. 2268-2272, 2010.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

- HENRICKS, D. et al.** Plasma Estrogen and Progesterone Levels After Mating, and During Late Pregnancy and Postpartum in Cows 1 2. *Endocrinology*, v. 90, n. 5, p. 1336-1342, 1972.
- JEWELL, T.** Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows. 2002. Virginia Polytechnic Institute and State University
- JONES, R. D. et al.** Bioavailability and pharmacokinetics of metoclopramide in cattle. *J Vet Pharmacol Ther*, v. 17, n. 2, p. 141-7, Apr 1994.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L.** Clinical biochemistry of domestic animals. Academic press, 2008. ISBN 0080568823.
- KNIGHTS, M.; SMITH, G. W.** Decreased ACTH secretion during prolonged transportation stress is associated with reduced pituitary responsiveness to tropic hormone stimulation in cattle. *Domestic animal endocrinology*, v. 33, n. 4, p. 442-450, 2007.
- MACMILLAN, K. et al.** Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Animal Reproduction Science*, v. 26, n. 1, p. 25-40, 1991.
- MACRINA, A. L.; KAUF, A. C. W.; KENSINGER, R. S.** Effect of bovine somatotropin administration during induction of lactation in 15-month-old heifers on production and health. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 9, p. 4566-4573, 2011.
- MACRINA, A. L.; TOZER, P. R.; KENSINGER, R. S.** Induced lactation in pubertal heifers: Efficacy, response to bovine somatotropin, and profitability. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 3, p. 1355-1364, 3// 2011.
- MAGLIARO, A. et al.** Induced lactation in nonpregnant cows: Profitability and response to bovine somatotropin. *Journal of dairy science*, v. 87, n. 10, p. 3290-3297, 2004.
- MALPRESS, F.** EXPERIEMENTAL INDUCTION OF LACTATION. *British Medical Bulletin*, v. 5, n. 2-3, p. 161-163, 1947.
- MANN, G.** Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Animal reproduction science*, v. 115, n. 1, p. 296-299, 2009.
- MELLADO, J. et al.** Milk Yield of Holstein Cows Induced into Lactation Twice Consecutively and Lactation Curve Models Fitted to Artificial Lactations. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 13, n. 6, p. 1349-1354, 2014.
- MELLADO, M. et al.** Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci*, v. 94, n. 9, p. 4524-30, Sep 2011.

- MELLADO, M. et al.** Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. *Animal Science*, v. 82, n. 04, p. 555-559, 2006.
- MELLOR, D.; STAFFORD, K.** Acute castration and/or tailing distress and its alleviation in lambs. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 48, n. 2, p. 33-43, 2000.
- MENEGHETTI, M. et al.** Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*, v. 72, n. 2, p. 179-189, 2009.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M.** Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v. 168, n. 1, p. 28-40, 7// 2004.
- NARENDHAN, R. et al.** Hormonal Induction of Lactation in the Bovine: Mammary Gland Histology and Milk Composition¹. *Journal of Dairy Science*, v. 57, n. 11, p. 1334-1340, 1974.
- REDAELLI, V. et al.** Use of thermography techniques in equines: principles and applications. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, n. 3, p. 345-350, 2014.
- SAWYER, G. et al.** Artificial induction of lactation in cattle: initiation of lactation and estrogen and progesterone concentrations in milk. *Journal of dairy science*, v. 69, n. 6, p. 1536-1544, 1986.
- SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M.; BUTLER, W.** Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. *Research in veterinary science*, v. 95, n. 1, p. 269-271, 2013.
- SILVA, L. A. F. et al.** Causas de descarte de vacas da raça holandesa confinadas em uma população de 2.083 bovinos (2000–2003). *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 2, p. 383-389, 2008.
- SMITH, K. L.; SCHANBACHER, F. L.** Hormone Induced Lactation in the Bovine. I. Lactational Performance Following Injections of 17 β -Estradiol and Progesterone¹. *Journal of Dairy Science*, v. 56, n. 6, p. 738-743, 6// 1973.
- SMITH, K. L.; SCHANBACHER, F. L.** Hormone Induced Lactation in the Bovine. II. Response of Nulligravida Heifers to Modified Estrogen-Progesterone Treatment¹. *Journal of Dairy Science*, v. 57, n. 3, p. 296-303, 1974.
- STEWART, M. et al.** Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Animal Welfare*, v. 14, n. 4, p. 319-325, 2005.
- STOTT, G.** What is animal stress and how is it measured? *Journal of Animal Science*, v. 52, n. 1, p. 150-153, 1981.

1 **TUCKER, H.** Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. Journal of
2 dairy science, v. 83, n. 4, p. 874-884, 2000.

3
4 **TUCKER, H. A.** Quantitative estimates of mammary growth during various physiological
5 states: a review. Journal of dairy science, v. 70, n. 9, p. 1958-1966, 1987.

6
7 **TURK, R. et al.** Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and
8 MDA level in transition dairy cows. Animal reproduction science, v. 108, n. 1, p. 98-106, 2008.

9
10 **WALKER, S. M.; STANLEY, A. J.** Effect of diethylstilbestrol dipropionate on mammary
11 development and lactation. Experimental Biology and Medicine, v. 48, n. 1, p. 50-53, 1941.

3 Considerações Finais

A indução da lactação é estudada desde a década de 40, sendo que os protocolos pouco evoluíram até hoje, pois atualmente se utiliza como base estudos da década de 70. Embora os protocolos não tenham evoluído significativamente quanto à praticidade, no decorrer dos anos surgiram várias alternativas de incorporação de diversos hormônios além da progesterona e estradiol, com alterações em manejo e com diferentes períodos de protocolos.

Pode se concluir que é possível induzir a lactação em vacas e novilhas de maneira satisfatória. Assim, esta técnica nos permite aumentar a vida útil dos animais, diminuir descarte precoce de fêmeas, aumentar a rentabilidade do animal e da propriedade e diminuir custos com reposição. Ainda há diversos relatos na literatura que indicam que animais com problemas reprodutivos submetidos ao protocolo voltam a gestar, sugerindo um efeito terapêutico da técnica, embora esta hipótese não tenha sido investigada.

Apesar das inúmeras vantagens, a técnica apresenta algumas limitações, como a frequência elevada de manejos, grandes volumes de hormônios aplicados (diluídos em veículo oleoso) e o prolongado período de estro. Para melhor entender a técnica e pelo fato de não haverem relatos de estudos que descrevem o possível estresse e o processo inflamatório causado pelo protocolo e pelo período de estro prolongado, investigou-se alguns marcadores de estresse e resposta inflamatória.

Nas condições estudadas o protocolo de indução não causou nenhuma resposta inflamatória local ou sistêmica. Embora os níveis de cortisol não tenham indicado estresse significativo, os animais submetidos ao protocolo apresentaram um longo período de estro, dificultando o seu manejo. Portanto, fica evidente a necessidade de aprimoramento dos protocolos de forma a minimizar o manejo e diminuir a manifestação de estro.

Para que seja possível a criação de protocolos alternativos, é necessário conhecer o perfil endócrino de vacas submetidas a protocolos sabidamente eficientes. Os valores de progesterona encontrados nas vacas induzidas no presente estudo sugerem que é possível induzir as vacas a lactarem utilizando a síntese de

progesterona do próprio corpo lúteo, ou através de implantes que possibilitem a liberação lenta de progesterona, o que reduziria a administração de hormônios. Quanto aos níveis de estradiol, seria possível explorar a meia-vida dos diferentes sais disponíveis e investigar a possibilidade da utilização de dispositivos de liberação lenta.

Coletivamente, pode-se concluir que, embora eficiente, a técnica de indução artificial da lactação tem muito a evoluir, principalmente no que se refere a mão-de-obra e manejos envolvidos. Estudos são necessários para melhor entender a fisiologia e as necessidades específicas da vaca induzida, uma categoria cada vez mais presente nas propriedades leiteiras.

Referências

ANTONCIC-SVETINA, M. et al. Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic parameters in serum of heifers and lactating cows related to oxidative stress. **Res Vet Sci**, v. 90, n. 2, p. 298-300, Apr 2011.

BASILE, R. et al. Equine inflammatory process evaluation using quantitative thermografic methodology. **Ars Veterinária**, v. 26, n. 2, p. 077-081, 2010.

BAUMAN D. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. **Domest Anim Endocrinol**, v.17, p.101-116, 1999.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 4, p. 1740-1750, 2007.

BÓ, G.; BARUSELLI, P.; MARTINEZ, M. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 307-326, 2003.

BROWNE, R. W. et al. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 310-317, February 1, 2007 2007.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 7/19/ 2012.

CHAKRIYARAT, S. et al. Induction of lactation: Lactational, physiological, and hormonal responses in the bovine. **J of Dairy Sci**, v. 61, n. 12, p. 1715-1724, 1978.

COLLIER RJ, BAUMAN DE, HAYS RL. Effect of reserpine on milk production and serum prolactin of cows hormonally induced into lactation. **J Dairy Sci**, v.60, p.896-901, 1977.

COLLIER RJ, BAUMAN DE, HAYS RL. Milk production and reproductive performance of cows hormonally induced into lactation. **J Dairy Sci**, v.58, p.1524-1527, 1975.

COOPER, C. et al. Cortisol, progesterone and β -endorphin response to stress in calves. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 75, n. 2, p. 197-201, 1995.

DAVIS SR, WELCH RAS, PEARCE MG, PETERSON AJ. Induction of lactation in nonpregnant cows by estradiol-17 β and progesterone from an intravaginal sponge. **J Dairy Sci**, v.66, p.450-457, 1983.

DE OLIVEIRA PAES, P. R. et al. O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 305-312, 2012.

ERB, R. E. et al. Estrogen, progesterone, prolactin and other changes associated with bovine lactation induced with estradiol-17beta and progesterone. **J Anim Sci**, v. 42, n. 3, p. 644-54, Mar 1976.

ERB, R. E. et al. Hormone induced lactation in the cow. IV. Relationships between lactational performance and hormone concentrations in blood plasma. **J Dairy Sci**, v. 59, n. 8, p. 1420-1428, 1976.

ERB RE. Hormonal control of mammogenesis and onset of lactation in cows: a review. **J Dairy Sci**, v.60, p.155-169, 1977

FERREIRA, C. P. et al. Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal./Plasma concentration of progesterone and cortisol in nelore cows (*bos taurus indicus*). **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 366-372, 2012.

FLEMING JR, HEAD HH, BACHMAN KC, BECKER HN, WILCOX CJ. Induction of lactation: histological and biochemical development of mammary tissue and milk yields of cows injected with estradiol-17 β and progesterone for 21 days. **J Dairy Sci**, v.69, p.3008-3021, 1986.

FREITAS, P. C. R. et al. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 10, p. 2268-2272, 2010.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

HENRICKS, D. et al. Plasma Estrogen and Progesterone Levels After Mating, and During Late Pregnancy and Postpartum in Cows 1 2. **Endocrinology**, v. 90, n. 5, p. 1336-1342, 1972.

IBGE 2015. Produção da Pecuária Municipal, 2015. Disponível em:
 <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default_xls.shtm
 > Acessado em 08 de Dezembro.

JEWELL T. **Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows**. 2002, 47f. Dissertation (Master of Science - DairyScience) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, 2002.

JONES RD, MIZINGA KM, THOMPSON FN, STUEDEMANN JA, BOWEN JM. Bioavailability and pharmacokinetics of metoclopramide in cattle. **J Vet Pharmacol Ther**, v.17, p.141-147, 1994.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. **Academic press**, 2008. ISBN 0080568823.

KNIGHTS, M.; SMITH, G. W. Decreased ACTH secretion during prolonged transportation stress is associated with reduced pituitary responsiveness to tropic hormone stimulation in cattle. **Domestic animal endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 442-450, 2007.

MACMILLAN, K. et al. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 1, p. 25-40, 1991.

MANN, G. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal reproduction science**, v. 115, n. 1, p. 296-299, 2009.

MACRINA AL, KAUF ACW, KENSINGER RS. Effect of bovine somatotropin administration during induction of lactation in 15-month-old heifers on production and health. **J Dairy Sci**, v.94, p.4566-4573, 2011a.

MACRINA AL, TOZER PR, KENSINGER RS. Induced lactation in pubertal heifers: efficacy, response to bovine somatotropin, and profitability. **J Dairy Sci**, v.94, p.1355-1364, 2011b.

MAGLIARO A, et al. Induced lactation in nonpregnant cows: Profitability and response to bovine somatotropin. **J Dairy Sci**, v.87,p.3290-3297, 2004.

MALPRESS F. Experimental induction of lactation. **Br Med Bull**, v.5, p.161-163, 1947.

MELLADO J, et al. Milk yield of holstein cows induced into lactation twice consecutively and lactation curve models fitted to artificial lactations. **J Integr Agric**, v.13, p.1349-1354, 2014.

MELLADO M, et al. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. **J Dairy Sci**, v.94, p.4524-4530, 2011.

MELLADO M, et al. Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. **Anim Sci**, v.82, p.555-559, 2006.

MELLOR, D.; STAFFORD, K. Acute castration and/or tailing distress and its alleviation in lambs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 48, n. 2, p. 33-43, 2000.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179-189, 2009.

Milkpoint. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/deficit-em-lacteos-ja-e-tres-vezes-maior-que-o-de-2015-102038n.aspx>> Acessado em 08 de Dezembro.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 7// 2004.

NARENDHAN R, HACKER RR, BATRA TR, BURNSIDE EB. Hormonal induction of lactation in the bovine: mammary gland histology and milk composition. **J Dairy Sci**, v.57, p.1334-1340, 1974.

REDAELLI, V. et al. Use of thermography techniques in equines: principles and applications. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 345-350, 2014.

SAWYER G, FULKERSON W, MARTIN G, GOW C. Artificial induction of lactation in cattle: initiation of lactation and estrogen and progesterone concentrations in milk. **J Dairy Sci**, v.69, p.1536-1544, 1986.

SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M.; BUTLER, W. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 269-271, 2013.

SILVA, L. A. F. et al. Causas de descarte de vacas da raça holandesa confinadas em uma população de 2.083 bovinos (2000–2003). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 383-389, 2008.

SMITH KL, SCHANBACHER FL. Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17β -estradiol and progesterone1. **J Dairy Sci**, v.56, p.738-743, 1973.

SMITH KL, SCHANBACHER FL. Hormone induced lactation in the bovine. II. Response of nulligravida heifers to modified estrogen-progesterone treatment. **J Dairy Sci**, v.57, p.296-303, 1974.

STEWART, M. et al. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. **Animal Welfare**, v. 14, n. 4, p. 319-325, 2005.

STOTT, G. What is animal stress and how is it measured. **J Animal Sci**, v. 52, n. 1, p. 150-153, 1981.

TUCKER H. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. **J Dairy Sci**, v.83, p.874-884, 2000.

TUCKER HA. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: a review. **J Dairy Sci**, v.70, p.1958-1966, 1987.

TURK, R. et al. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 108, n. 1, p. 98-106, 2008.

WALKER SM, STANLEY AJ. Effect of diethylstilbestrol dipropionate on mammary development and lactation. **Exp Biol Med**, v.48, p.50-53, 1941.

Anexos

Pelotas, 14 de janeiro de 2015

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professor Bernardo Garziera Gasperin

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

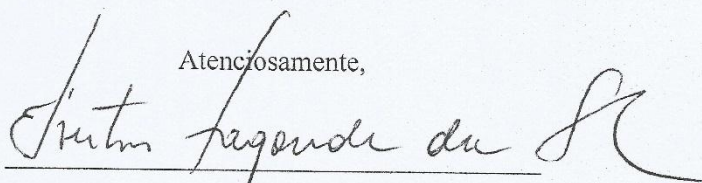
A CEEA analisou o projeto de extensão intitulado: **“Indução da lactação em fêmeas bovinas: avaliação do perfil endócrino e de marcadores de resposta inflamatória”**, processo nº23110.010524/2014-71, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 10524-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 015 / 01 / 2015

Assinatura do Professor Responsável:

